Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# INTERAKTIONEN VON LH UND TESTOSTERON ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN DER GESCHLECHTSREIFUNG BEI KASTRIERTEN MÄNNLICHEN RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

WILFRIED HARTHAN
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# INTERAKTIONEN VON LH UND TESTOSTERON ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN DER GESCHLECHTSREIFUNG BEI KASTRIERTEN MÄNNLICHEN RATTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

WILFRIED HARTHAN
aus Stuttgart

1983

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller

Herrn Professor Dr. D. Gupta
danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die jederzeit gern gewährte Unterstützung und die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Manfred Eichner
danke ich für die kontinuierliche Betreuung und die vielen technischen Tips während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Diethelm Harthan und Angelika Hilbert
danke ich für die Hilfe bei der Herstellung und Entwicklung der Fotografien.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0006

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| | Inhaltsverzeichnis | 1 |
| | Abkürzungen | 4 |
| 1. | Einleitung | 5 |
| 1.1. | Allgemein | |
| 1.2. | Die Methode zur Materialgewinnung | 7 |
| 1.3. | Bestimmung des Serumvolumens in Relation zum Körpergewicht | 8 |
| 2. | Fragestellung | 9 |
| 3. | Methode | 10 |
| 3.1. | Versuchsübersicht | |
| 3.2. | Die Tierhaltung | |
| 3.3. | Die Narkose | 11 |
| 3.3.1 | Vorbemerkung | |
| 3.3.1.1. | Mangelnde Analgesie | |
| 3.3.1.2. | Möglichkeit der Kumulation | |
| 3.3.1.3. | Störungen des Metabolismus von Testosteron | 12 |
| 3.3.2. | Die Apparatur | |
| 3.3.2.1. | Der Ätherbehälter | |
| 3.3.2.2. | Mischer | |
| 3.3.2.3. | Inhalator | 13 |
| 3.3.3. | Der Narkoseverlauf | |
| 3.3.3.1. | Vorbetäubung | |
| 3.3.3.2. | Einbringen des Kopfes in den Inhalator | |
| 3.3.3.3. | Die Narkosetiefe | 14 |
| 3.3.3.4. | Der Narkosezwischenfall | |
| 3.3.3.5. | Die optimale Narkose | 15 |
| 3.4. | Die Orchiektomie | |
| 3.5. | Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials | |
| 3.5.1. | Vorbemerkung | 16 |
| 3.5.2. | Die Präparation von Vena iliaca externa und Vena saphena magna | |
| 3.5.3. | Punktion der Vena iliaca externa | 17 |


UNIV. ZÜRICH BIBL.

| | | |
|---|---|---|
| 3.5.4. | Heparinisierung | |
| 3.5.5. | Die Injektion von Testosteron bzw. Kontroll-flüssigkeit | 18 |
| 3.5.5.1. | Die Testosteron-Lösung | |
| 3.5.5.2. | Die Kontroll-Lösung | 19 |
| 3.5.6. | Die Blutentnahme | |
| 3.6. | Die Serumgewinnung | 25 |
| 3.6.1. | Das LH-Serum | |
| 3.6.2. | Das Testosteron-Serum | |
| 3.7. | Bestimmung des Testosteron-Konzentration | |
| 3.7.1. | Allgemein | |
| 3.7.2. | Bestimmung der Radioaktivität | 26 |
| 3.8. | Bestimmung der LH-Konzentration im Serum | 27 |
| 3.8.1. | Allgemeine Theorie des Radioimmunassays | |
| 3.8.2. | Bestimmung der LH-Konzentration im Serum nach der RIA-Methode | 30 |
| 3.8.2.1. | Obersicht | |
| 3.8.2.2. | Die Jodierung des Hormons (Chloramin - T-Methode) (108) | |
| 3.8.2.3. | Messung der Radioaktivität | 33 |
| 3.8.2.4. | Herstellung der Sephadex-G-75-Säule | |
| 3.8.2.5. | Test auf Bindung mit dem Antikörper | |
| 3.8.2.6. | Die Standardverdünnung | |
| 3.8.2.7. | Die Standardkurve | 34 |
| 3.8.2.8. | Technischer Ablauf der RIA-Methode zur Bestimmung der LH-Konzentration im Serum | 35 |
| 3.9. | Die Bestimmung des Hämatokrits | 36 |
| 3.10. | Bestimmung des Verhältnisses von Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen | |
| 3.10.1. | Allgemein | |
| 3.10.2. | Vorbereitung | 37 |
| 3.10.3. | Die Injektion der Lösung | |
| 3.10.4. | Die Bestimmung der Serumaktivität | |
| 3.10.5. | Messung der Radioaktivität | |
| 4. | Materialien | 38 |

| | | |
|---|---|---|
| 5. | Ergebnisse | 41 |
| 5.1. | Das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen | |
| 5.2. | Die Kurvenverläufe der direkt gemessenen Konzentrationen für Testosteron und LH bei den Versuchstieren, sowie einer LH-Kontrollkurve für Tiere, denen kein Testosteron appliziert wurde | |
| 5.2.1. | Erwachsene Tiere, 90 Tage alt | |
| 5.2.2. | Pubertäre Tiere, 35 Tage alt | |
| 5.2.3. | Präpubertäre Tiere, 20 Tage alt | 42 |
| 5.3. | Korrektur der durch Volumensubstitution bedingten Serumvermehrung anhand des Hämatokrits (HK-Bereinigung) | |
| 5.4. | Verdeutlichung der Ergebnisse durch verschiedene Darstellungen der Testosteronkurven | 51 |
| 5.4.1. | Direkt gemessene Werte | |
| 5.4.2. | Korrektur der unterschiedlichen Relationen zwischen Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen | |
| 5.4.3. | Korrektur des Hämatokritabfalls | 52 |
| 5.4.4. | Gleichzeitige Korrektur von Hämatokritabfall und unterschiedlicher Körpergewicht-Gesamtserumvolumen-Relationen | |
| 5.5. | Zusammenfassung | 57 |
| 6. | Diskussion | 58 |
| 6.1. | Narkose | |
| 6.2. | Die Materialgewinnung | 59 |
| 6.3. | Ergebnisse | 60 |
| 6.3.1. | Testosteron-Clearance | |
| 6.3.2. | Die LH-Verlaufskurven | 61 |
| 6.4. | Zusammenfassung | 63 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 64 |

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| AB | = Antikörper (antibody) |
| B | = gebunden (bound) |
| cpm | = gezählte Impulse (counts) pro Minute |
| DHT | = Dihydrotestosteron |
| F | = frei (free) |
| FSH | = Follikelstimulierendes Hormon |
| HHGA | = Hypothalamisch-hypophysär-gonadale Achse |
| HK | = Hämatokrit |
| LH | = Luteinisierendes Hormon |
| LH-RH | = LH- Releasing Hormone |
| RIA | = Radioimmunassay |

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemein

Die verschiedenen Ereignisse der Pubertät, das Wachstum und die Ausreifung der Geschlechtsorgane, sowie die Entwicklung der extragenitalen Geschlechtsmerkmale ist an die Anwesenheit eines ausreichend hohen Spiegels an Sexualhormonen im Serum gebunden. Zu Beginn der Pubertät kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Östrogene bei der Frau und des Testosterons beim Mann. Diese Tatsache ist neben verschiedenen klinischen Untersuchungen am Menschen auch durch zahlreiche Tierexperimente belegt. So steigt bei männlichen Ratten das Testosteron von ca 50ng/100ml mit Beginn der Pubertät am 26. Tag nach der Geburt sprunghaft an und erreicht bei den erwachsenen Tieren einen Wert zwischen 250 und 300 ng/100ml. (1)

Obwohl eine umfassende endokrinologische Klärung dieser Tatsache, sowie der übrigen Ereignisse während der Pubertät noch immer aussteht, wird es zunehmend klarer, daß den endokrinologischen Regelmechanismen der Sexualhormone eine zentrale Bedeutung zukommt. Dieser Regelmechanismus, die hypothalamisch-hypophysär-gonadale Achse (HHGA), ist in seinen Grundzügen erforscht und allgemein anerkannt.

Der Hypothalamus produziert das Luteinisierende Hormon-Releasing Hormone (LH-RH), das in der Hypophyse die Produktion und Ausschüttung des Luteinisierenden Hormons (LH) stimuliert. Das LH wirkt nun zum einen auf den Hypothalamus im Sinne eines negativen Feedback und zum anderen auf die Leydig´schen Zwischenzellen der Hoden, wo es die Produktion von Testosteron stimuliert. Das Testosteron entfaltet an den verschiedenen Zielorganen (siehe oben) seine spezifische Wirkung. Auf den Hypothalamus selbst wirkt es im Sinne eines negativen Feedback und führt zu einer Senkung des Gonadotropinspiegels. Auf diese Weise pendelt sich ein kon-

stanter Testosteronspiegel im Serum ein. Diese negative Feedback des Testosterons auf Hypothalamus und Hypophyse mit einer Senkung der Serumkonzentrationen der Gonadotropine LH und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) ist in den verschiedensten Arbeiten untersucht worden, wobei sowohl intakte als auch kastrierte männliche Ratten mit Testosteron und Östradiol behandelt wurden. (2-10)

Tatsache ist nun aber weiter, daß sich dieser Regelmechanismus nach der Pubertät auf einen höheren Testosteronspiegel einpendelt. Dies führte zu der Annahme, daß die Sensibilität der HHGA auf das negative Feedback des Testosterons unter der Pubertät abnimmt; das heißt, daß eine höhere Testosteronkonzentration im Serum erforderlich ist, um eine Suppression der Gonadotropinausschüttung zu bewirken. An welcher Stelle der Achse eine solche Veränderung eintreten soll, ist bis heute unklar.

Inzwischen liegen jedoch auch Arbeiten vor, die zeigen, daß die endokrinologischen Vorgänge, die den Beginn der Pubertät auslösen, zu kompliziert sind, als daß sie mit einem einzelnen Feedbacksystem zu erklären wären. So führt zum Beispiel eine chronische Applikation von Androstanediol nicht wie erwartet zu einer Suppression, sondern im Gegenteil zu einer Stimulation der Gonadotropinausschüttung. (11)

Des weiteren besteht Grund zu der Annahme, daß sich während der Pubertät nicht nur die Testosteronwirkung auf die HHGA, sondern auch auf verschiedene andere Zielorgane, das heißt der Testosteronmetabolismus insgesamt, verändert. Die Vorstellung, die dieser Annahme zugrunde liegt, ist die, daß eine erhöhte Serumkonzentration von Testosteron nicht unbedingt eine erhöhte Konzentration an den entsprechenden Rezeptoren der HHGA zur Folge haben muß, dann nämlich, wenn das Testosteron an den anderen Zielorganen entsprechend beschleunigt abgebaut wird. Hinweise, die für eine solche Annahme sprechen, gibt es verschiedene.

So ist in einigen androgenabhängigen Organen des Menschen nicht das Testosteron, sondern sein Metabolit, das 5-alpha-Dihydrotestosteron (DHT) die eigentlich wirksame androgene Substanz. So verfügt zum Beispiel der zytoplasmatische Androgenrezeptor in der Prostata über eine sehr hohe Affinität zum DHT, während im Knochenmark die erythropoetische Wirkung über Testosteron und kaum über DHT vermittelt ist. (12)

Der Metabolismus von Testosteron zu DHT ist über ein Enzym, die 5-alpha-Reduktase vermittelt. Dieses Enzym unterliegt seinerseits regulativen Einflüssen. Seine Aktivität wird durch die Anwesenheit von Androgenen induziert, des weiteren ist ein nicht mit den Gonadotropinen identischer Hypophysenfaktor an der Erhaltung der Aktivität beteiligt. (12) Diese 5-alpha-Reduktase ist in den verschiedenen Zielorganen des Testosterons nicht gleichmäßig verteilt. So ist zum Beispiel die Enzymaktivität im fetalen Hypothalamus höher als im übrigen Cerebrum. (13) Und im Muskelgewebe fehlen überhaupt ausreichende Aktivitäten zur Bildung von DHT. (14)

Diese wenigen Stichworte mögen genügen, um zu zeigen, daß das Testosteron in den verschiedenen Zielorganen auf sehr unterschiedliche Weise direkt oder als Metabolit wirkt. Von daher wäre ein Vergleich einzelner Wirkmechanismen von Testosteron und/oder seiner Metaboliten zwischen Tieren unterschiedlichen Alters ausgesprochen interessant, zumal verschiedene Arbeiten gezeigt haben, daß die Ingangsetzung der Pubertät mit einer veränderten Sensibilität der HHGA allein offenbar nicht ausreichend erklärt werden kann (siehe oben).

## 1.2. Die Methode zur Materialgewinnung

Sämtliche Methoden zur Materialgewinnung laufen darauf hi-

naus, daß für jeden gewünschten Meßpunkt ein Tier geopfert wird. Auf diese Weise erhält man aber zum einen eine sehr große Streubreite, zum andern werden keine tatsächlichen Konzentrationsverläufe an einem einzelnen Tier gemessen. Einer mehrmaligen Blutentnahme zu den jeweils gewünschten Meßpunkten steht jedoch bei den gängigen Versuchstieren, Ratten und Mäusen, ein relativ geringes Blutvolumen, sowie das Fehlen einer adäquaten Methode entgegen.

### 1.3. Bestimmung des Serumvolumens in Relation zum Körpergewicht

Sämtliche Pharmaka werden in Tierversuchen in Relation zum Körpergewicht appliziert ungeachtet der Tatsache, daß in den verschiedenen Altersgruppen das Serumvolumen bezogen auf das Körpergewicht unterschiedlich groß ist. Auf diese Weise ergeben sich von vornherein erhebliche Schwankungen in den Serumkonzentrationen der applizierten Pharmaka. Die Notwendigkeit zur Quantifizierung dieses Effekts ergab sich im Anschluß an den Versuch.

## 2. Fragestellung

Aus der Einleitung ergeben sich drei Probleme als Fragestellung:

1. Gibt es einen Hinweis darauf, daß der Metabolismus des Testosterons in einzelnen Bereichen bei den verschiedenen Altersgruppen "erwachsen", "pubertär" und "präpubertär" verschieden abläuft, und wie sind die Auswirkungen dieser Unterschiede auf die Gonadotropinausschüttung?

2. Eine Methode, die eine mehrmalige Blutentnahme zu den jeweils gewünschten Meßpunkten erlaubt.

3. Das Verhältnis von Serumvolumen zu Körpergewicht in den verschiedenen Altersgruppen.

Unter dieser Fragestellung wurde die Testosteron-Clearance aus dem Serum bei kastrierten männlichen Ratten nach der Gabe von Testosteron untersucht. Zur Bestimmung der Auswirkungen auf den Gonadotropinspiegel wurde zu jedem Meßpunkt auch das LH bestimmt. Die Versuchsanordnung war so gewält, daß von jedem Tier mehrere Blutentnahmen vorgenommen werden konnten.

## 3. Methode

### 3.1. Versuchsübersicht

Die Tiere wurden orchiektomiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurde zunächst die Vena iliaca externa freipräpariert und anschließend punktiert. Nach der Applikation von Testosteron wurde den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen, und die Serumkonzentration von Testosteron und LH bestimmt. Sämtliche Eingriffe wurden in Narkose durchgeführt.

Das Wesentliche an dieser Versuchsanordnung besteht darin, daß von jedem einzelnen Tier mehrere Hormonbestimmungen gemacht werden können, was gegenüber einer Versuchsanordnung, die für jeden Meßpunkt ein Tier opfert, eine deutliche Eingrenzung der Schwankungsbreite zur Folge hat.

### 3.2. Die Tierhaltung

Die Tiere, die in diesem Experiment verwendet wurden, waren männliche Ratten des Ivanovas-Stammes (aus Kißlegg im Allgäu). Es handelt sich dabei um einen Inzuchtsstamm mit weitgehend übereinstimmenden genetischen Merkmalen. Die erwachsenen Tiere waren 90, die pubertären Tiere 35 und die präpubertären Tiere 20 Tage alt. Die Tiere wurden in Gemeinschaftskäfigen gehalten (5 bis 6 erwachsene und 10 bis 14 jugendliche Ratten), und zwar bis zur Kastration, anschließend bis zum eigentlichen Versuch in Einzelkäfigen. Diese Maßnahme hatte sich in den Vorversuchen als sinnvoll herausgestellt, weil die Tiere nach der Kastration auf eine erneute Entnahme aus dem Gemeinschaftskäfig ausgesprochen ängstlich reagierten, insbesondere die jeweils letzten Tiere aus einem Käfig. Durch die Verwendung von Einzelkäfigen konnte dieser Faktor ausgeglichen werden. Von 6.00 Uhr bis

19.00 wurde künstliches Licht gegeben, Wasser und Nahrung nach Belieben.

## 3.3. Die Narkose

### 3.3.1. Vorbemerkung

Sämtliche operativen Eingriffe, sowie der Versuch selbst wurden in Narkose durchgeführt. Das gängige Narkosemittel für derlei Experimente ist wegen seines schnellen Wirkungseintrittes, seiner ausreichenden Wirkungsdauer und seiner unkomplizierten intraperitonealen Applikation das Pentobarbital (Nembutal$^{R}$). In diesem Versuch wurde jedoch darauf verzichtet und der Inhalationsnarkose mit Äther der Vorzug gegeben. Die Gründe hierfür waren:

#### 3.3.1.1. Mangelnde Analgesie

Wie alle Barbiturate hat auch das Nembutal nahezu keine Analgesie, sondern wirkt nur hypnotisch. Die vegetativen Schmerzreaktionen sind mit einer Nembutal-Mononarkose nicht ausreichend gedämpft. Im Gegensatz dazu verfügt der Äther über eine ausgezeichnete Analgesie neben seiner hypnotischen Wirkung.

#### 3.3.1.2. Möglichkeit der Kumulation

Da im weiteren Verlauf des Experiments Äthanol appliziert werden mußte, sollte der Gefahr einer Kumulation des Narkosemittels von vornherein begegnet werden. Da der Äther zu 80% abgeatmet wird, bot er sich auch unter diesem Aspekt als Narkosemittel an.

3.3.1.3. Störungen des Metabolismus von Testosteron

Da Testosteron ebenso wie Pentobarbital und Äthanol in der Leber metabolisiert wird, hätte der Versuchsablauf beeinflußt werden können, zumal Untersuchungen gezeigt haben, daß Testosteron im toxisch geschädigten Lebergewebe langsamer abgebaut wird. (15) Auch unter diesem Aspekt bot sich der Äther als Narkosemittel an.

3.3.2 Die Apparatur

Die Narkosapparatur ist in Abbildung Nr. 1 zu sehen. Sinn dieser Apparatur war zum einen eine möglichst einfache Handhabung, zum anderen eine möglichst exakte Narkosesteuerung. Die Apparatur bestand aus drei Komponenten. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die entsprechenden Hinweise in Abbildung Nr.1.

3.3.2.1. Der Ätherbehälter (1)

Ein 500 ml - Erlenmeyerkolben war mit 200 ml Äther gefüllt und mit einem zweifach gebohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Öffnung führte ein Steigrohr (4), durch das dem System Raumluft zugeführt wurde. Von der anderen Öffnung ging ein Verbindungsschlauch (5) zum

3.3.2.2. Mischer (2)

Ein 250 ml - Erlenmeyerkolben war zur Beschwerung mit Steinchen gefüllt und mit einem dreifach gebohrten Gummistopfen verschlossen. Durch das erste Loch führte der Verbindungsschlauch (5) vom Ätherbehälter, durch das zweite geht als zusätzliche Luftzufuhr ein Glashahn (6) und von dem dritten geht ein Verbindungsschlauch (7) zum

3.3.2.3. Inhalator (3)

Der Inhalator besteht aus einem Glasrohr von 8 cm Länge und 6 cm Durchmesser für die erwachsenen und pubertären Tiere und 4 cm Durchmesser für die präpubertären Tiere. Auf der einen Seite ist das Rohr mit einem zweifach gebohrten Stopfen verschlossen. Der eine Verbindungsschlauch (7) kommt vom Mischer, der andere (8) führt zu einer Wasserstrahlpumpe, deren Sog für eine kontinuierliche Durchströmung der gesamten Apparatur mit dem jeweils eingestellten Äther-Luft-Gemisch sorgt. An der anderen Seite des Rohrs befindet sich eine umgeschlagene Plastikfolie. Wird der Kopf des Tieres in die Öffnung eingebracht, so legt sich diese Folie durch einen Gummiring an den Hals des Tieres an, das somit nur noch das angebotene Äther-Luft-Gemisch inhalieren kann.

3.3.3. Der Narkoseverlauf

3.3.3.1. Vorbetäubung

Die Vorbetäubung des Tieres erfolgt in einem gesonderten Ätherbehälter, in dem das Tier ein reines Äther-Luft-Gemisch atmet. Kurz nach Ausfall des Gleichgewichtssinns ist die Vorbetäubung ausreichend, und das Tier kann ohne Gegenwehr entnommen werden.

3.3.3.2. Einbringen des Kopfes in den Inhalator

Dabei ist darauf zu achten, daß es nicht zu einer Strangulation kommt. Dies wird vermieden, indem man darauf achtet, daß der Gummiring über den Unterkiefer läuft, daß sich die Augen innerhalb und die Ohren außerhalb des Inhalators befinden. Eine Verlegung der Atemwege durch ein Zurückfallen

der Zunge kann verhindert werden, indem man den Nacken des Tieres unterlegt und damit überstreckt.

### 3.3.3.3. Die Narkosetiefe

Die Steuerung der Narkose erfolgt durch die Regulation des Ätheranteils am Atemgemisch. Diese Einstellung kann an verschiedenen Stellen der Apparatur erfolgen. Die absolute Menge des angesaugten Äther-Luft-Gemischs wird durch die Saugkraft der Wasserstrahlpumpe bestimmt. Die Zusammensetzung des Gemischs hängt zum einen ab von der Tiefe, mit der das Steigrohr unter den Ätherpegel im Ätherbehälter taucht, zum andern von der Luftzufuhr durch den Glashahn im Mischer.

Ist der Glashahn völlig geöffnet, wird kein Äthergemisch aus dem Ätherbehälter angesaugt und das Tier atmet die reine Raumluft. Ist er völlig geschlossen, so atmet es das reine Äther-Luft-Gemisch aus dem Ätherbehälter.

Um nun die Steuerung der Narkosetiefe ausschließlich über den Glashahn im Mischer regulieren zu können, muß zum einen die Einstellung der Wasserstrahlpumpe konstant gehalten und zum andern die Menge des verdunsteten Äthers laufend über das Steigrohr im Ätherbehälter nachgefüllt werden, damit sich der Pegel stets auf gleicher Höhe befindet.

### 3.3.3.4. Der Narkosezwischenfall

Falls es im Verlauf des Versuches unter der Narkose zu einem Kreislaufstillstand kam, wurde eine Reanimation durchgeführt. Die externe Herzmassage erfolgt mit einem Finger. Zur Beatmung wurde ein Gummischlauch auf die Nase gesetzt, das Maul zugehalten und gleichzeitig der Nacken überstreckt. Auf diese Weise ließ sich die Reanimation gut durchführen.

3.3.3.5. Die optimale Narkose

Eine optimale Narkose liegt vor, wenn eine ausreichende Analgesie vorhanden ist und gleichzeitig der Organismus des Tieres so wenig wie möglich belastet wird. Die Analgesie kann als ausreichend angesehen werden, wenn durch den Stich einer Kanüle in die Pfote kein Fluchtreflex mehr erfolgt. Als Parameter für eine möglichst geringe Belastung kann eine ruhige, leichte Atmung angesehen werden. Die Beurteilung einer "normalen" Atmung erfordert eine gewisse Routine. Außerdem ist eine kurze Beobachtungszeit nach Narkosebeginn erforderlich, da die Wirkungsdosis bei den verschiedenen Tieren sehr stark schwankt.

3.4. Die Orchiektomie

Durch die Entfernung der Testes kommt die körpereigene Testosteronbildung zum Erliegen, sodaß die im Versuch applizierte Menge an Testosteron tatsächlich die einzig pharmakologisch wirksame Menge darstellt.

Die Orchiektomie wird in Narkose durchgeführt. Zunächst wird das Skrotum eröffnet. Bei den präpubertären Tieren müssen die Testes teilweise zuerst palpiert und durch Massage in das Skrotum befördert werden. Nach Eröffnung der Fascia spermatica sind die Testes leicht herauszuziehen. Samenstrang, sowie die Arteria und Vena testicularis werden unterbunden und distal davon durchtrennt. Nach Entfernung beider Hoden wird das Skrotum wieder verschlossen.

3.5. Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Mit der Gewinnung des Untersuchungsmaterials beginnt der eigentliche Versuch zwischen 12 und 24 Stunden nach der Orchiektomie. Die Applikation des Testosterons sowie die

Entnahme des Blutes erfolgt durch eine Kanüle, die an der Vena iliaca externa unter Sicht gelegt wird.

### 3.5.1. Vorbemerkung

Die Anatomie der Gefäße des Rattenbeines stellt sich dem zoologisch ungeschulten Auge manchmal etwas kompliziert dar, weil sich die menschlichen Verhältnisse nicht unbedingt übertragen lassen. So war auch unter Heranziehung von zoologischer Literatur (16) nicht zu klären, ob es sich bei dem in Abbildung Nr. 5 mit (2) bezeichneten Gefäß um die Vena femoralis oder die Vena saphena magna handelt. In dieser Arbeit wird es als Vena saphena magna bezeichnet, ohne jedoch den Anspruch zu erheben der rattenanatomischen Weisheit letzter Schluß zu sein. Ähnliches gilt für das "Periphere Gefäß", das in Abbildung Nr.4 mit (2) bezeichnet ist und für das eine anatomisch exakte Bezeichnung nicht zu finden war.

### 3.5.2. Die Präparation von Vena iliaca externa und Vena saphena magna

Zurest wird die Haut im Inguinalbereich mit der Pinzette abgehoben und dann mit der Schere durchtrennt (siehe Abbildung Nr. 2). Dann erfolgt mittels stumpfer Präparation die Abtrennung der inguinalen Subkutis von der Bauchmuskelfaszie (siehe Abbildung Nr. 3). Dabei ist darauf zu achten, daß ein peripheres Gefäß (siehe Abbildung Nr.4), das zur Flanke zieht, nicht verletzt wird.

Die Durchtrennung von Cutis und Subcutis erfolgt durch einen ca 2 cm langen Schnitt nach kranial, ca 1 cm parallel zur Medianlinie. Der Hautlappen wird mit einer Klemme nach lateral gezogen, wobei das periphere Gefäß ebenfalls nach lateral zu liegen kommt. Nach Durchtrennung der inguinalen Faszien ist die Vena iliaca externa bis zum Leistenband

gut einsichtbar (siehe Abbildung Nr.4).

Anschließend wird die Vena saphena magna proximal des Eintritts des peripheren Gefäßes mit atraumatischem Nahtmaterial (Vitalene 5-0, Firma Dr. Hammer & Co, Hamburg) umstochen und unterbunden.

### 3.5.3. Punktion der Vena iliaca externa

Die Punktion der Vena iliaca externa erfolgt knapp proximal der Einmündung der Vena saphena magna und zwar mit einer Kanüle Butterfly$^{R}$ - 21, INT(0,8 mm), Firma Abbott Ireland Limited, Sligo, Irland. Die Punktion erweist sich als nicht ganz einfach, zum einen, weil das Kaliber der Kanüle das Gefäßlumen fast ausfüllt, zum andern, weil die Gefäßwand gegen jegliche Läsion außerordentlich empfindlich ist. Wenn die Kanüle nicht sofort beim ersten Versuch "sitzt", kann keine weitere Punktion mehr vorgenommen werden. Ist die Punktion erfolgreich gewesen, wird der Butterfly an den Flügeln mit einem Pflaster fixiert, und zwar am günstigsten so, daß die Kanülenöffnung der Gefäßwand nicht unmittelbar anliegt.

### 3.5.4. Heparinisierung

Unmittelbar nach der Punktion erfolgt die Applikation eines Heparinpräparats (Vetren$^{R}$) in einer Konzentration von 100 I.E./ml. Die erwachsenen Tiere erhalten 0,8 ml, die pubertären Tiere 0,4 ml und die Präpubertären Tiere 0,3 ml. Dadurch wird eine Gerinnung des Blutes mit Sicherheit vermieden.

Nach jeder Injektion, sowie nach jeder Blutentnahme wird das Butterfly-System mit 0,5 ml einer Spülflüssigkeit aus 40 ml physiologischer NaCl-Lösung und 2 ml Vetren durchgespült.

3.5.5. Die Injektion von Testosteron bzw. Kontrollflüssigkeit.

Einige Minuten nach der Heparinisierung erfolgt die Injektion. Dieser Zeitpunkt wird für den weiteren Versuchsablauf als $t_0$ bezeichnet.

3.5.5.1. Die Testosteron-Lösung

Es wurde eine Mischung von normalem (kaltem) Testosteron und radioaktiv markiertem (heißem) Testosteron ($^3H$) hergestellt. Man geht dabei von einer gleichmäßigen Durchmischung aus, sodaß die anschließend im Serum gemessene Radioaktivität entsprechend dem Lösungsansatz ein relatives Maß für die Gesamtkonzentration an Testosteron darstellt.

Das markierte Testosteron mit einer Aktivität von 250 uCi ist in 250 ul einer Lösung von Benzol:Äthanol = 9:1 gelöst. Um einer eventuell auch nur kurzfristigen Toxizität bzw. einer Ausfällung des Benzols im Serum von vornherein zu begegnen, wurde das Lösungsmittel in einem Exsikator verdampft und durch 25o ul Äthanol ersetzt. Es ergibt sich, bezogen auf 100 g Körpergewicht folgender Ansatz:

für erwachsene und pubertäre Tiere:
25 ug Testosteron gelöst in 1o ul Äthanol
Testosteron markiert (1 uCi)
90 ul physiologische NaCl-Lösung,

für präpubertäre Tiere
25 ug Testosteron gelöst in 10 ul Äthanol
Testosteron markiert (1 uCi)
190 ul physiologische NaCl-Lösung.

Die Verdoppelung der insgesamt applizierten Menge bei gleicher Testosteronkonzentration bezogen auf das Körpergewicht bei den präpubertären Tieren erfolgte, um überhaupt zu applizierbaren Mengen zu kommen.

3.5.5.2. Die Kontrollösung

Die Kontrolltiere wurden genauso behandelt wie die Versuchstiere der jeweiligen Altersgruppe. Entsprechend der Versuchsanordnung war die Kontrollösung bis auf das Testosteron identisch, d.h. sie setzte sich bezogen auf 100 g Körpergewicht zusammen aus 10 ul physiologischer NaCL-Lösung bei den erwachsenen und präpubertären, bzw. 190 ul physiologischer NaCl-Lösung bei den präpubertären Tieren.

3.5.6. Die Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte zu folgenden Zeitpunkten (in Minuten) nach der Injektion:

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Erwachsene Tiere: | $t_5$, | $t_{15}$, | $t_{30}$, | $t_{60}$, | $t_{90}$, | $t_{120}$, | |
| pubertäre Tiere: | $t_5$, | | $t_{30}$, | $t_{60}$, | $t_{90}$, | $t_{120}$ | und |
| präpubertäre Tiere: | $t_5$, | | | $t_{60}$, | | $t_{120}$. | |

Die erste Blutentnahme erfolgte erst nach 5 Minuten, weil zu einem früheren Zeitpunkt eine gleichmäßige Verteilung der injizierten Lösung im Intravasalraum nicht gewährleistet gewesen wäre.

Zu jedem Meßpunkt wurden 0,5 ml Blut abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, außerdem wurde mit einem Kapillarröhrchen Blut zur Bestimmung des Hämatokritwertes aufgenommen. Unmittelbar nach der Entnahme erfolgte der Volumenersatz durch o,5 ml physiologischer NaCl-Lösung sowie das Durchspülen des Butterfly-Systems.

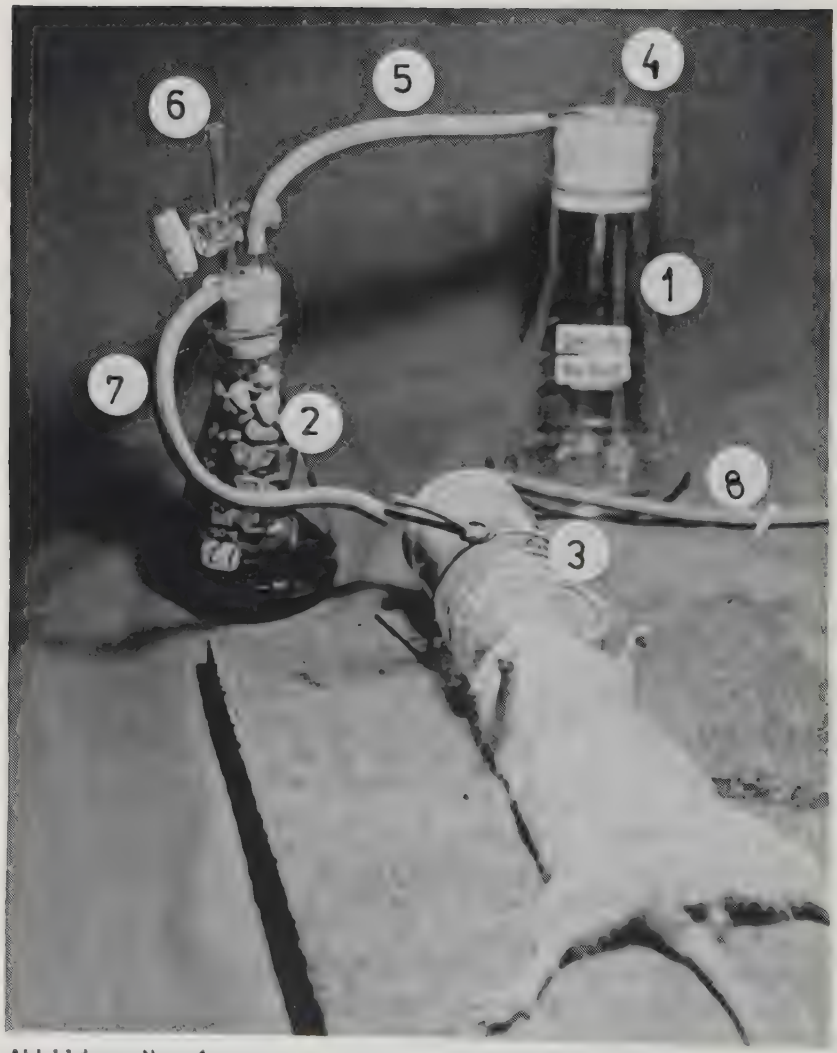


Abbildung Nr. 1

zeigt die verschiedenen Teile der Narkoseapparatur, den Ätherbehälter (1) mit dem Steigrohr (4), den Mischer (2) mit dem Glashahn (6), den Inhalator (3), die Verbindungsschläuche (5) und (7) und den letzten Verbindungsschlauch (8) zur Wasserstrahlpumpe (nicht im Bild).

Abbildung Nr. 2
zeigt das Abheben des Fells im Inguinalbereich und die Durchtrennung der Cutis.

Abbildung Nr. 3
zeigt die Abtrennung der inguinalen Subkutis von der Bauchmuskelfaszie mittels stumpfer Präparation.

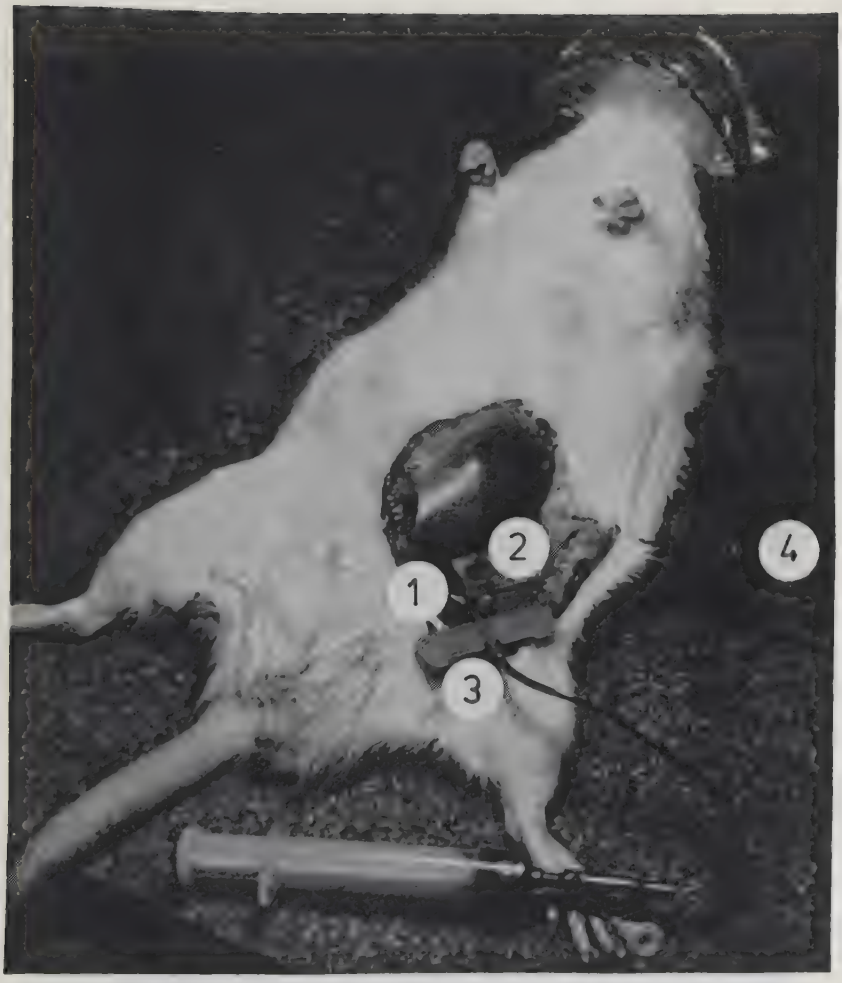


Abbildung Nr. 4
zeigt die freipräparierte Leistenbeuge. Die Kanüle des Butterfly-Systems (3) liegt in der Vena iliaca externa (1). Am Butterfly-System ist eine Spritze angeschlossen. Eine Klemme (4) zieht die Cutis nach lateral und eröffnet den Blick auf ein peripheres Gefäß (2).

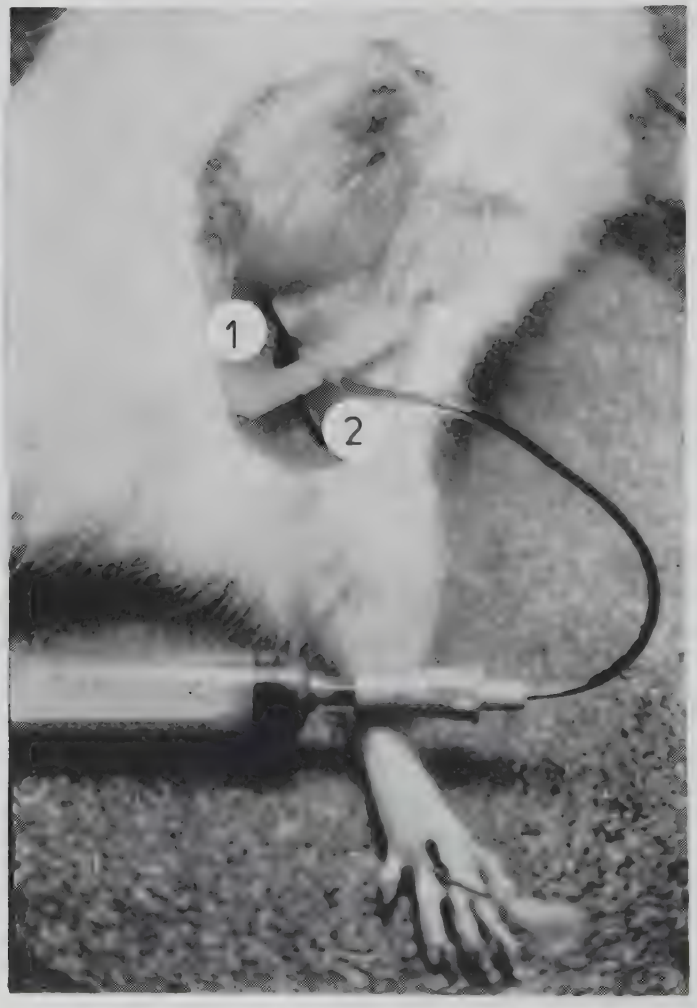


Abbildung Nr. 5
zeigt noch einmal die freipräparierte Leistenbeuge mit der Vena iliaca externa (1) und dem fraglichen Gefäß (2), siehe 5.1., hier als Vena saphena magna bezeichnet.

### 3.6. Die Serumgewinnung

Für jeden Meßpunkt wurden ca 0,5 ml heparinisiertes Blut abgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen aufbewahrt. In einer Tischzentrifuge (Firma Christ, Typ UJ 2) wurde bei 3000 U/min ca 10 bis 15 Minuten lang abzentrifugiert. Das Serum wurde sofort abpipettiert und zwar für die jeweiligen Untersuchungen in 2 Portionen.

#### 3.6.1. Das LH-Serum

Die Serumprobe zur Bestimmung der LH-Konzentration wurde sofort entnommen. 200 ul wurden in ein Reagenzröhrchen aus Plastik zum einmaligen Gebrauch gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei minus 20 Grad Celsius eingefroren.

#### 3.6.2. Das Testosteron-Serum

Die Serumprobe zur Bestimmung der Testosteron (1,2,6,7,-$^{3}$H(N))-Konzentration wurde ebenfalls sofort abpipettiert. 100 ul wurden in ein Szintillationsröhrchen mit 1o ml PoPoP gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei plus 4 Grad Celsius aufbewahrt.

### 3.7. Bestimmung der Testosteron-Konzentration

#### 3.7.1. Allgemein

Eine direkte Bestimmung der Testosteronkonzentration im Serum mit einem Radioimmunassay hätte bei gleichzeitiger Bestimmung der LH-Konzentration eine so große Serummenge erfordert, daß einem einzelnen Tier kaum mehr als eine Blutentnahme hätte zugemutet werden können, genau das aber war

der Sinn der Versuchsanordnung. Deshalb wurde das kristallin vorliegende Testosteron in Äthanol gelöst, mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit radioaktiv markiertem Testosteron (1,2,6,7,-$^{3}$H(N)) in einem bestimmten Ansatz (siehe 3.5.5.1) versetzt. Gemäß diesem Ansatz ist die jeweils gemessene Radioaktivität ein relatives Maß für die Gesamttestosteron-Konzentration im Serum.

### 3.7.2. Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität werden 100 ul der zu untersuchenden Serumprobe in ein Szintillationsröhrchen mit 10 ml einer speziellen Szintillationsflüssigkeit, dem PoPoP gegeben. Der Ansatz dieser Flüssigkeit lautet:
2500 ml Toluol
12,5 g 2,5 Dipheyloxalol
250 mg 2,2,-p-Phenylenbis(5-phenyloxalol).

Sinn dieser Szintillationsflüssigkeit ist eine möglichst große Ausbeute (gain) an Zählimpulsen (counts). Diese werden in einem Beta-Zähler (Marke Packard Tri Carb Scintillation Spectrometer Model 2002) registriert und zwar jeweils über 300.Sekunden in insgesamt 3 Durchläufen. Es wird der Mittelwert gebildet und die Summe der ständig registrierten Strahlung als Hintergrund (background) subtrahiert.

Die Radioaktivität wird nun angegeben in counts pro minute (cpm). Da nach dieser Versuchsanordnung nur der Konzentrationsverlauf, also nur die relativen Werte von Belang sind, kann eine Umrechnung auf die absoluten Konzentrationen unterbleiben und die gemessenen cpm als relatives Maß für die jeweilige Testosteron-Konzentration im Serum angesehen werden.

## 3.8. Bestimmung der LH-Konzentration im Serum

Die Bestimmung der LH-Konzentration im Serum erfolgte mittels eines Radioimmunassays.

### 3.8.1. Allgemeine Theorie des Radioimmunassays

Im Gegensatz zu den Steroidhormonen sind die Proteohormone mangels spezifischer Gruppen in eiweißhaltigem Milieu wie dem Blutplasma nicht chemisch zu bestimmen. Die derzeit beste und allgemein praktizierte Methode ist der Radioimmunassay (RIA).

Er beruht auf der Tatsache, daß in einem immunologischen System eine hochspezifische Reaktion zwischen einem Antigen und dem entsprechenden Antikörper stattfindet. Hierbei fungiert nun das zu untersuchende Proteohormon als Antigen und wird von einem hochspezifischen globulären Antikörper erkannt und in einem Komplex aus beiden Molekülen gebunden, dem Antigen-Antikörper-Komplex. Aus diesem kann das Antigen durch ein anderes, zum Beispiel radioaktiv markiertes Antigen verdrängt werden.

Die Grundlage des RIA besteht nun darin, daß eine Wettbewerbssituation zwischen dem radioaktiv markierten Hormon und dem unmarkierten (kalten) zu untersuchenden Hormon um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers erzeugt wird.

$^{125}$J-Hormon (F) + kaltes Hormon + Antikörper (AB) → $^{125}$J-Hormon-AB (B) + kaltes Hormon-AB

F = Free (frei)
B = Bound (gebunden)
AB = Antibody (Antikörper).

Gibt man nun diesem System weiteres kaltes Hormon hinzu, so verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen freiem markiertem Hormon (F) und gebundenem markierten Hormon (B) zugunsten des freien markierten Hormons, das Verhältnis von B:F wird kleiner. Die Konzentration an freiem markiertem Hormon ist also ein Maß für die Konzentration an freiem kaltem Hormon.

Will man diese nun bestimmen, so vergleicht man die Ergebnisse mit einer zuvor bestimmten Serie von Standardverdünnungen bekannter Konzentrationen von unmarkiertem Hormon. Das Ergebnis dieser Standardverdünnungen wird graphisch aufgetragen, und zwar die mit mit wachsender Konzentration von kaltem Hormon kleiner werdenden Verhältnisse von B:F. Man erhält die Standardkurve.

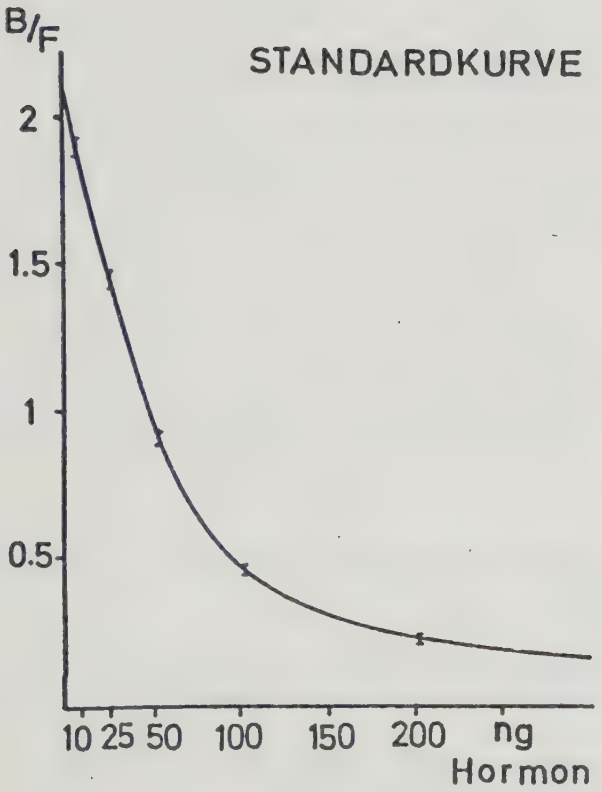


Abbildung Nr. 6
zeigt eine Standardkurve, bei der B/F ("Bound" zu "Free") gegen steigende Standard-Hormonmenge aufgetragen ist.

### 3.8.2. Bestimmung der LH-Konzentration im Serum nach der RIA-Methode

#### 3.8.2.1. Übersicht

Gereinigtes Ratten-LH wird mit $^{125}$Jod markiert. Die jeweiligen Serumproben werden mit einem spezifischen LH-Antikörper versetzt und gehen mit diesem einen Antigen-Antikörper-Komplex ein. Diesem Gemisch wird eine konstante Menge an markiertem LH zugesetzt, das sich teilweise in den Komplex einbaut, und zwar entsprechend der LH-Konzentration im zu untersuchenden Serum. Ist diese hoch, so wird wenig markiertes Antigen eingebaut und umgekehrt. Insgesamt besteht nun ein Gemisch aus kaltem und markiertem Komplex, sowie aus kaltem und markiertem LH. Zur Trennung von Komplex und freiem Antigen bedient man sich eines Tricks, da der Antigen-Antikörper-Komplex allein zu klein ist, um sich mittels Zentrifugation abtrennen zu lassen. Man gibt einen zweiten Antikörper hinzu, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Es entsteht nun ein so großer Komplex, daß sich dieser abtrennen läßt. Der Überstand kann abgegossen und die Radioaktivität im Sediment bestimmt werden. Entsprechend der zuvor erstellten Standardkurve läßt sich nun die LH-Konzentration der jeweiligen Serumprobe ablesen.

#### 3.8.2.2. Die Jodierung des Hormons (Chloramin - T - Methode (108)

Die einzelnen Arbeitsschritte und das Pipettieren bei der Jodierung erfolgen in einer festen Reihenfolge:

1. 2 ug des Hormons (normalerweise in 20 ul Puffer)
2. 20 ul des 0,5 M Phosphatpuffers
3. 0,5 m Cl $^{125}$J (entsprechend normalerweise 0,5 ul Lösung)
4. 10 ul Chloramin T (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuf-

fer gelöst)

5. Reaktionszeit 1 Minute; dabei auf einem Schüttelgerät (Typ Rotamixer, Fa. Hock + Tucker HT) schütteln.
6. 30 ul Natriumpyrosulfit (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)
7. 100 ul Transferlösung
8. Übertragung des Reaktionsgemischs auf die Sephadexsäule (G-75-Füllung)
9. Reaktionsgefäß mit 2 mal 20 ul 2 % BSA Lösung nachspülen und ebenfalls auf die Sephadexsäule übertragen
10. Sephadexsäulenfüllung mit 0,01 M Phosphatpuffer eluieren
11. Fraktionen von je 1 ml sammeln (Vorlage: 0,5 ml 2 % BSA - Lösung)

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich die Elutionskurve.

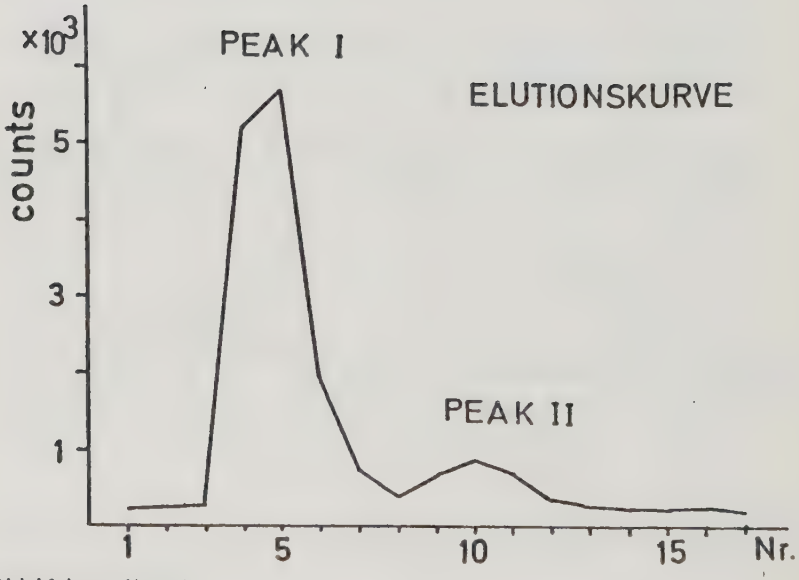


Abbildung Nr. 7
zeigt die Elutionskurve, wie man sie nach der Auftrennung des Jodierungsgemisches auf einer Sephadex-G-75-Säule (10 bis 13 cm lang, ca 1 cm Durchmesser) mit Elutionspuffer erhält. Dabei sind die fortlaufend nummerierten Proben gegen die jeweils gemessenen counts aufgetrageb. Peak I der Elutionskurve bedeutet das radioaktiv markierte LH, während Peak II -auch als Salzpeak bezeichnet- Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen, sowie freies Jod darstellt.

3.8.2.3. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte in einem Gamma-Zähler (Typ Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer Nr. 5160 oder Tracerlab Gamma/guard 150). Dabei wurden die Impulse, die von der radioaktiven Substanz ausgestrahlt wurden, über einen Zeitraum von 180 Sekunden registriert und als counts gezählt. Die Summe der ständig registrierten Strahlen wurden als Hintergrund (background) von jedem Meßergebnis der jeweiligen Probe subtrahiert.

3.8.2.4. Herstellung der Sephadex-G-75-Säule

5 bis 6 g Sephadex werden in destilliertem Wasser oder 0,01 M Phosphatpuffer ca 6o Minuten lang gekocht und über Nacht zum Quellen stehen gelassen. Ist das Sephadex gequollen, so wird die Glassäule in der gewünschten Höhe gefüllt. Anschließend muß man noch mit 0,01 M Phosphatpuffer, der mit 2 % Rinderserumalbumin versetzt ist, 2 bis 3 mal eluieren.

3.8.2.5. Test auf Bindung mit dem Antikörper

Ein Test auf die immunologische Bindungsfähigkeit ist unbedingt erforderlich, weil das radioaktiv markierte LH durch den Jodierungsprozeß selbst, sowie durch verschiedene andere physikalische und chemische Ereignisse denaturiert oder auf sonstige Weise in seiner immunolgischen Wirkung verändert sein kann. Als $B_0$ - Bindung bezeichnet man die Bindung an den Antikörper in der nichtkompetitiven Situation, d.h. in Abwesenheit des nichtmarkierten LH.

3.8.2.6. Die Standardverdünnung

Für die Erstellung der Standardkurve wird das Standard-LH in verschiedenen Konzentrationen benötigt. Dazu wird eine

Verdünnungsreihe hergestellt. Die "Reference Preparation" wird mit Diluent auf eine Stammkonzentration von 100 ug/ml verdünnt. Weitere Verdünnungen ergeben Abstufungen von 500 bis 2,5 ng/100ul.

### 3.8.2.7. Die Standardkurve

Die Standardkurve kann auf verschiedene Weise dargestellt werden. Hier wurden Counts gegen die Hormonmenge aufgetragen. Die Counts bedeuten den im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Teil der Gesamtradioaktivität. Für diesen Versuch ergab sich folgende Standardkurve:

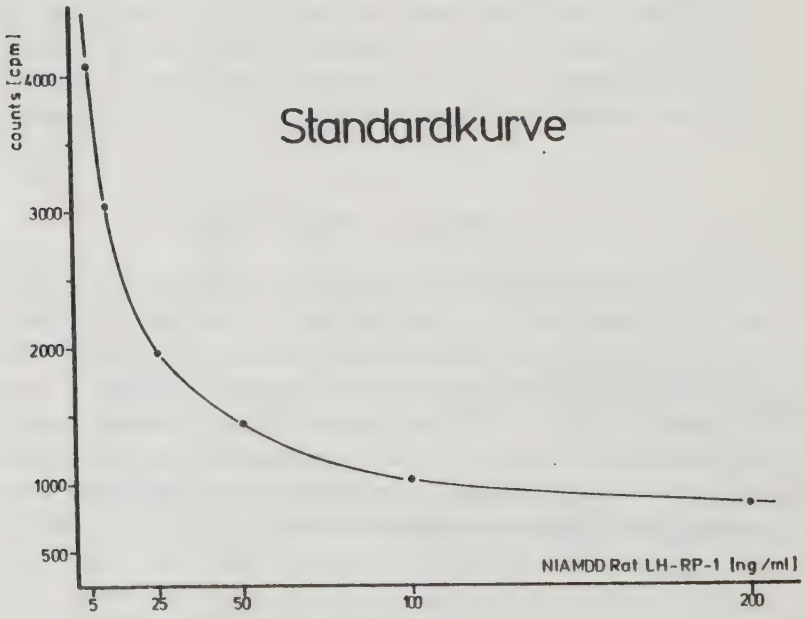


Abbildung Nr. 8
zeigt die Standardkurve dieses Versuchs. Es ist die Radioaktivität in cpm gegen die Hormonmenge in ng/ml aufgetragen.

3.8.2.8. Technischer Ablauf der RIA-Methode zur Bestimmung der LH-Konzentration im Serum

Im Wesentlichen wurden die vom National Institute of Health Bethesda Md., USA herausgegebenen Richtlinien übernommen. Die folgenden Schritte wurden der Reihenfolge nach durchgeführt:

1. Als Assayröhrchen wurden Reagenzröhrchen aus Plastik zum einmaligen Gebrauch verwendet.
2. Diluent in genügender Menge für ein Gesamtreaktionsvolumen von 800 ul wurde zugegeben.
3. Weiter zugegeben wurde das zu untersuchende Serum (200 ul) bzw. die Standardverdünnung der Reference Preparation von 500 bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen, daß eine Verdünnungskurve gezeichnet werden kann.
4. 200 ul des LH-Antiserums in einer Arbeitsverdünnung von 1:10000 in mit 3% normalem rabbit Serum versetzten Phosphatpuffer.
5. Dieses Gemisch wurde auf dem Rotamix-Schüttler kurz aufgeschüttelt und 24 Stunden bei 4 Grad Celsius inkubiert.
6. Anschließend wurden 100 ul jodiertes LH in einer Verdünnung von 40000 counts pro 200 Sekunden dazugegeben.
7. Dieses Gemisch wurde in der gleichen Weise aufgeschüttelt und ebenfalls 24 Stunden bei 4 Grad Celsius inkubiert.
8. Anschließend wurden 200 ml 1:12 verdünntes Anti-rabbit-gamma-Globulin dazugegeben. Dies bewirkte die maximale Präzipitation des im Komplex gebundenen LH. Die Verdünnung erfolgte mit 0,01 M Phosphatpuffer.
9. Auch dieses Gemisch wurde kurz aufgeschüttelt und 3 Tage lang bei 4 Grad Celsius inkubiert.
10. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000 x g über 2 Stunden. Der Überstand wurde abgekippt und das Präzipitat im Packard Gamma-Zähler gezählt.
11. Aus den gezählten counts der Röhrchen mit den unbekannten Mengen wurde die LH-Konzentration bestimmt, indem

man sie mit den counts der Standardverdünnungen vergleicht. Dazu wird graphisch eine Kurve dieser Standardwerte konstruiert und die Werte der unbekannten Proben direkt aus dieser Kurve abgelesen (siehe Abbildung Nr. 8). Die Werte werden als ng NIAMDD Rat LH-RP-1 per ml Serum ausgedrückt.

### 3.9. Die Bestimmung des Hämatokrits

Zu jedem Meßwert des Versuchs wurde ebenfalls der Hämatokrit bestimmt, um die durch Volumensubstitution bedingte relative Vermehrung des Serums quantitativ erfassen zu können.

Unmittelbar nach jeder Blutentnahme wurde ein Hämatokrit-Kapillarröhrchen gefüllt, an einem Ende über einer Gasflamme zugeschmolzen, in einer Hämatokrit-Micro-Zentrifuge zentrifugiert und der entsprechende Wert auf einem Hämatokrit-Reader (Firma Hawksley, England) abgelesen.

### 3.10. Bestimmung des Verhältnisses von Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen

#### 3.10.1. Allgemein

Das zirkulierende Blutvolumen wurde mit Hilfe der Verdünnung von Jodiertem Humanalbumin ($^{125}J$) bestimmt. Es wurde eine Lösung bekannter Menge und bekannter Aktivität injiziert. Aus der Verdünnung ließ sich das Gesamtvolumen errechnen. Mit der gleichzeitigen Bestimmung von Hämatokrit und Körpergewicht des Tieres erhielt man die notwendigen Parameter zur Bestimmung der Relation von Körpergewicht zu Gesamtserumvolumen.

### 3.10.2. Vorbereitung

Die Tierhaltung, sowie die Präparation und Punktion der Vena iliaca externa, sowie die Narkose erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben.

### 3.10.3. Die Injektion der Lösung

Als Injektionslösung wurde ein Gemisch aus
15 ml 20 %iger Humanalbuminlösung,
5 ml Vetren der gleichen Konzentration wie oben und
1 ml jodierter Humanalbuminlösung mit einer spezifischen Aktivität von 50 mCi/ml verwendet.

Den erwachsenen Tieren wurden 0,5 ml, den pubertären Tieren 0,3 ml und den präpubertären Tieren 0,1 ml dieser Lösung appliziert.

### 3.10.4. Die Bestimmung der Serumaktivität

5 Minuten nach Applikation der jodierten Humanalbuminlösung erfolgte die Dekapitation des Tieres und die Gewinnung des Blutes. Die Bestimmung des Hämatokrits und das Zentrifugieren erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Von dem gewonnenen Serum wurden 100ul abpipettiert und in Reagenzröhrchen aus Plastik zum einmaligen Gebrauch bei 4 Grad Celsius bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.10.5. Messung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in der oben beschriebenen Art und Weise im Packard Gamma-Zähler.

## 4. Materialien

Soweit in der Beschreibung der Methode nicht extra erwähnt, wurden folgende Materialien verwendet:

Firma Merck, Darmstadt

| | |
|---|---|
| Dinatriumhydrogenphosphat x $H_2O$ | Nr. 6580 |
| Natriumdihydrogenphosphat x $H_2O$ | Nr. 6345 |
| Natriumchlorid | Nr. 6404 |
| Kaliumjodid neutral | Nr. 5043 |
| Äthylendinitrilotetraessigsäure EDTA | Nr. 8414 |
| Chloramin T (Trihydrat) | Nr. 2426 |
| Natriumpyrosulfit | Nr. 6528 |
| Bromphenolblau | Nr. 8122 |
| Äther | Nr. 921 |
| Toluol | Nr. 8325 |
| Äthanol | Nr. 972 |

Firma Serva-Feinbiochemika, Heidelberg

| | |
|---|---|
| Saccharose reinst | Nr. 35580 |
| Äthylmercurithiosalicylsäure (Merthiolat) | Nr. 11375 |
| Testosteron | Nr. 35800 |

Behringwerke, Marburg/Lahn

Rinderserumalbumin
Humanalbumin

Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, England

Rabbit Serum Inactivated
Precipitating Serum for Radio-Immunassay
(Anti-Rabbit Gamma-Globulin)

Firma Amersham Buchler, Braunschweig

Jod - 125 (Na-Salz) IMS. 30

Jodiertes ($^{125}$J) Humanalbumin

National Institute of Arthritis and metabolic deseases and disorders (NIAMDD), Bethesda MD., USA

Purified Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Rat LH-I-3)
Antiserum to Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat LH-RP-1)

Packard Instruments International, Frankfurt

2,5 Diphenyloxalole Scintillation Grade (PPO) Nr. 6002026
2,2-p-Phenylenbis(5-phenyloxalol (PoPoP) Nr. 6002034

NEN, New England Nuclear, Boston, USA

NET-370 Testosterone(1,2,6,7,-$^{3}$H(N))

Promonta, Hamburg

Vetren, 100 I.E. Heparin / ml

Braun, Melsungen

Physiologische NaCl-Lösung 0,9 %

Elutionspuffer für die Jodierung: pH 7,6

13,2 ml 0,1 M $NaH_2Po_4 \times 2H_2O$ +
86,8 ml 0,1 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ +
8,7 n NaCl = 0,15 M +
100 mg Merthiolat = 0.01 M
ad 1 l $H_2O$ dest.

Diluent: pH 7,6
Elutionspuffer für die Jodierung +
1 % Rinderserumalbumin

Stammpuffer: pH 7,6

Stammpuffer: pH 7,6

3,45 ml $NaH_2PO \times 2H_2O$ +
0,8737 g $Na_2HPO_4 \times H_2O$ +
pH Angleichung mit 1 N NaOH
ad 500 ml $H_2O$ dest.

Assaypuffer pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung +
18,6 g EDTA +
30 ml Rabbitserum
ad 1 l $H_2O$ dest.

Transferlösung:
1 % KJ +
16 % Sucrose in P 1 +
Bromphenolblau (Spur)

2 % BSA Lösung

2g Rinderserumalbumin in Elutionspuffer für die Jodierung.

# 5. Ergebnisse

## 5.1. Das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen

Bezogen auf 100 g Körpergewicht haben Tiere im Alter von

| | | | |
|---|---|---|---|
| 90 Tagen: | 3,6 ml Serum | und | 6,6 ml Blut, |
| 35 Tagen: | 5,0 ml Serum | und | 7,6 ml Blut, |
| 20 Tagen: | 7,8 ml Serum | und | 11,4 ml Blut. |

## 5.2. Die Kurvenverläufe der direkt gemessenen Konzentrationen für Testosteron und LH bei den Versuchstieren, sowie einer LH-Kontrollkurve für Tiere, denen kein Testosteron appliziert wurde.

### 5.2.1. Erwachsene Tiere, 90 Tage alt

Die entsprechenden Kurvenverläufe sind in Abbildung Nr. 9 zu sehen. Testosteron zeigt einen sehr starken Abfall von 3450 cpm bei $t_5$ auf 210 cpm bei $t_{60}$. Von da an fällt die Aktivität nur noch unwesentlich bis auf 90 cpm bei $t_{120}$.

Das LH fällt von 120 ng/ml bei $t_5$ nur noch unwesentlich auf 57 ng/ml bei $t_{120}$. Der Schnittpunkt mit Testosteron liegt bei $t_{15}$. Ein Vergleich mit der LH-Kontroll-Kurve zeigt keinen signifikanten Unterschied.

### 5.2.2. Pubertäre Tiere, 35 Tage alt

Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung Nr. 10 zu sehen. Testosteron zeigt von einem niedrigeren Ausgangspunkt bei $t_5$ einen bedeutend schwächeren Abfall bis $t_{60}$, und zwar von 1650 cpm auf 220 cpm. Von da an erfolgt ebenfalls nur noch ein unwesentlicher Abfall bis $t_{120}$.

Das LH zeigt ausgehend von 88 ng / ml bei $t_5$ über einen leichten Anstieg bei $t_{30}$ einen deutlichen Abfall auf 34 ng/ml. Der Schnittpunkt mit Testosteron liegt etwas später bei $t_{120}$. Der Vergleich mit der LH-Kontroll-Kurve zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

### 5.2.3. Präpubertäre Tiere, 20 Tage

Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung Nr. 11 dargestellt. Der Aktivitätsabfall für Testosteron ist noch mehr abgeschwächt. Die Kurve startet bei $t_5$ mit 1550 cpm und ist bei $t_{60}$ immer noch auf 490 cpm, von wo aus nur noch ein unwesentlicher Abfall auf 270 cpm in $t_{120}$ erfolgt.

Das LH fällt von 96 ng/ml bei $t_5$ auf 23 ng/ml bei $t_{60}$ und verläuft von da an nahezu waagerecht. Zu einem Schnittpunkt mit Testosteron kommt es nicht mehr, er liegt hinter $t_{120}$. Einen signifikanten Unterschied zur LH Kontrollkurve ist auch hier nicht ersichtlich.

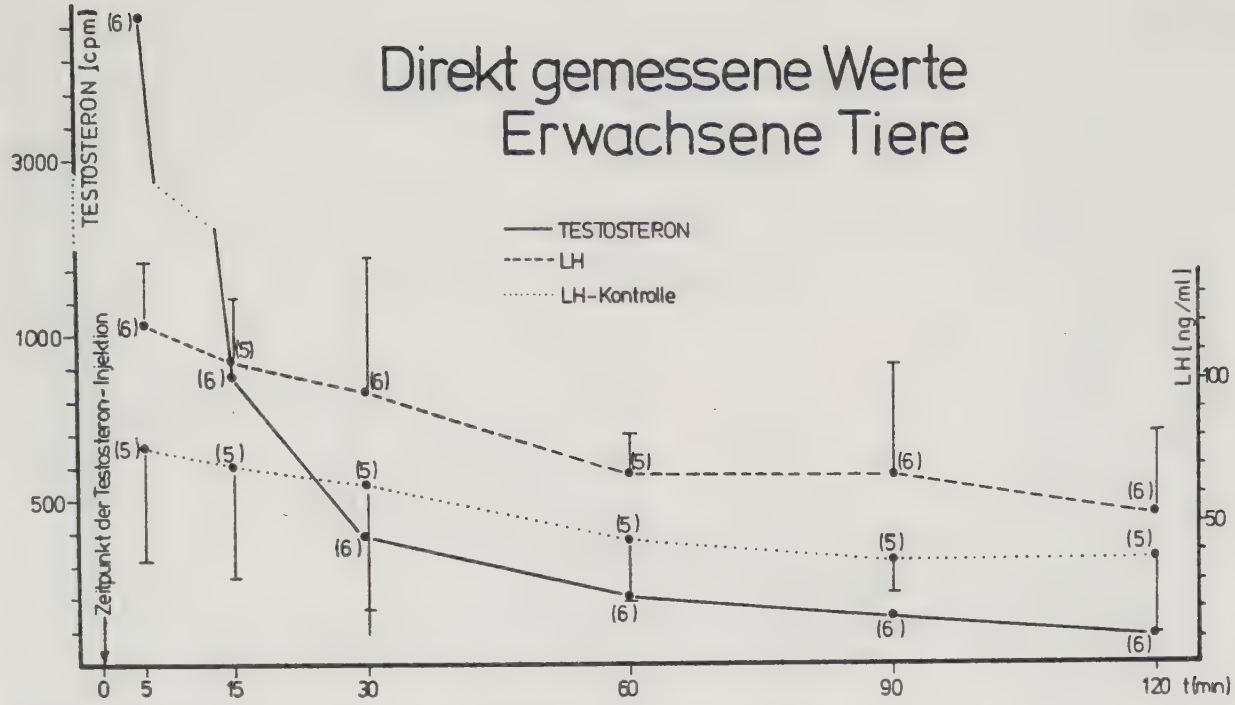


Abbildung Nr. 9

Erläuterung auf der nächsten Seite

Abbildung Nr. 9
zeigt die Konzentrationsverläufe für Testosteron und LH für die Altersgruppe von 90 Tagen, sowie eine LH-Kontrollkurve für Tiere der gleichen Altersgruppe, denen jedoch kein Testosteron appliziert wurde. Für LH und LH-Kontrolle ist zu jedem Wert die Standarabweichung eingezeichnet. Die Zahl in Klammern neben jedem Wert besagt die Anzahl der Tiere, aus der der jeweilige Mittelwert bestimmt wurde.

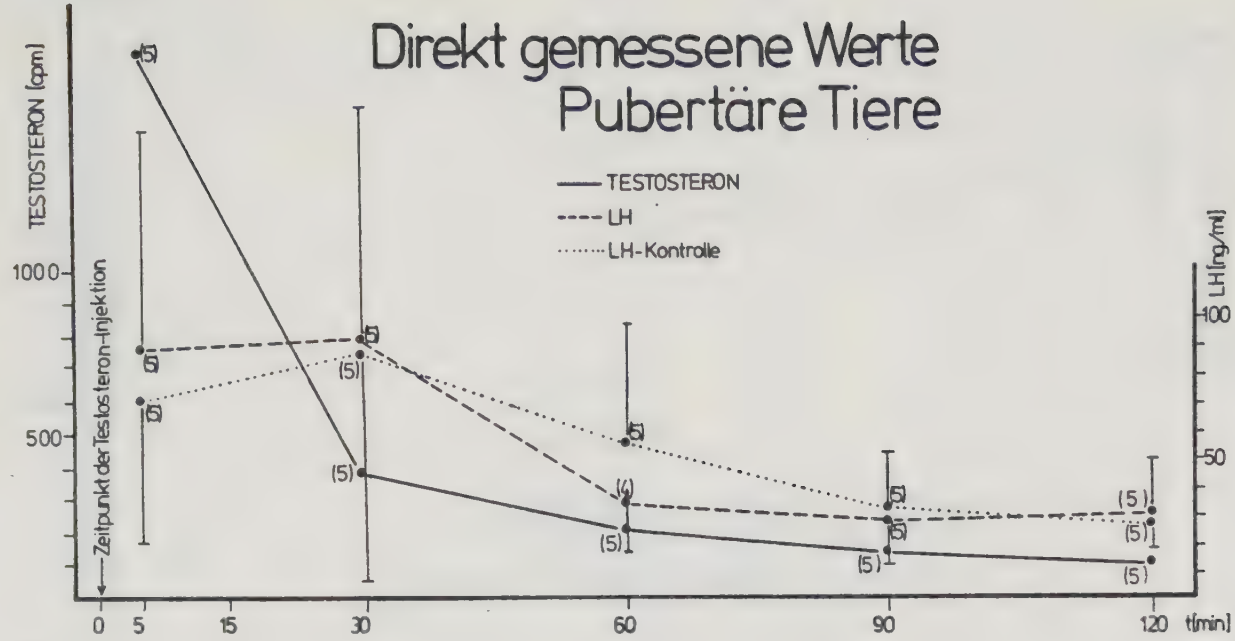


Abbildung Nr. 10

zeigt analog zu Abbildung Nr. 9 die entsprechenden Kurven für die Tiere der Altersgruppe von 35 Tagen.

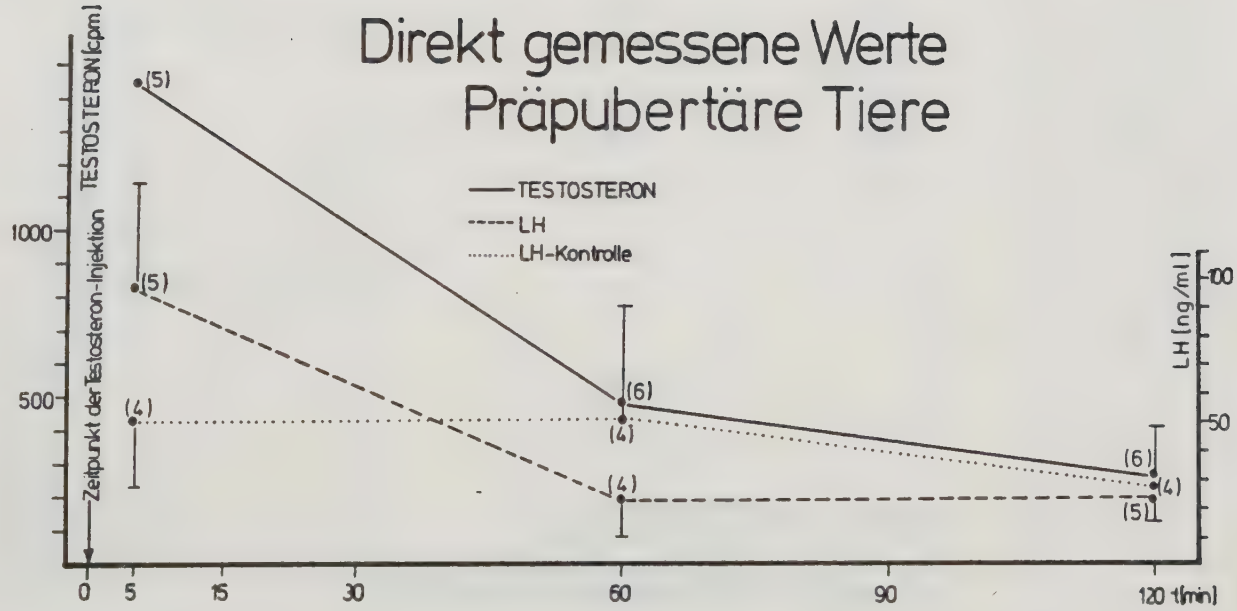


Abbildung Nr. 11

zeigt analog zu Abbildung Nr. 9 die entsprechenden Kurven für die Tiere der Altersgruppe von 20 Tagen

## 5.3. Korrektur der durch Volumensubstitution bedingten Serumvermehrung anhand des Hämatokrits (HK-Bereinigung)

Durch die laufende Substitution des entnommenen Blutvolumens durch physiologische NaCl-Lösung (siehe 5.6.) kommt es zu einer Vermehrung des Serums und als Ausdruck dessen zu einem Abfall des Hämatokrits. Entsprechend verringert sich die Serumkonzentration der zu untersuchenden Hormone. Dieser zusätzliche Verdünnungsfaktor wurde ausgeglichen, indem der Hämatokrit des Ausgangswertes als Basis genommen und jeder weitere Meßwert um den entsprechenden Hämatokritabfall korrigiert wurde.

Auf diese Weise entstanden die Kurven für die HK-bereinigten Werte. Abbildung Nr.12 zeigt sie für die erwachsenen, Abbildung Nr. 13 für die pubertären und Abbildung Nr. 14 für die präpubertären Tiere.

In keiner Altersgruppe kommt es zu einer grundsätzlichen Änderung des Kurvenverlaufs. Der Hämatokritabfall bewirkt nur Veränderungen in Nuancen.

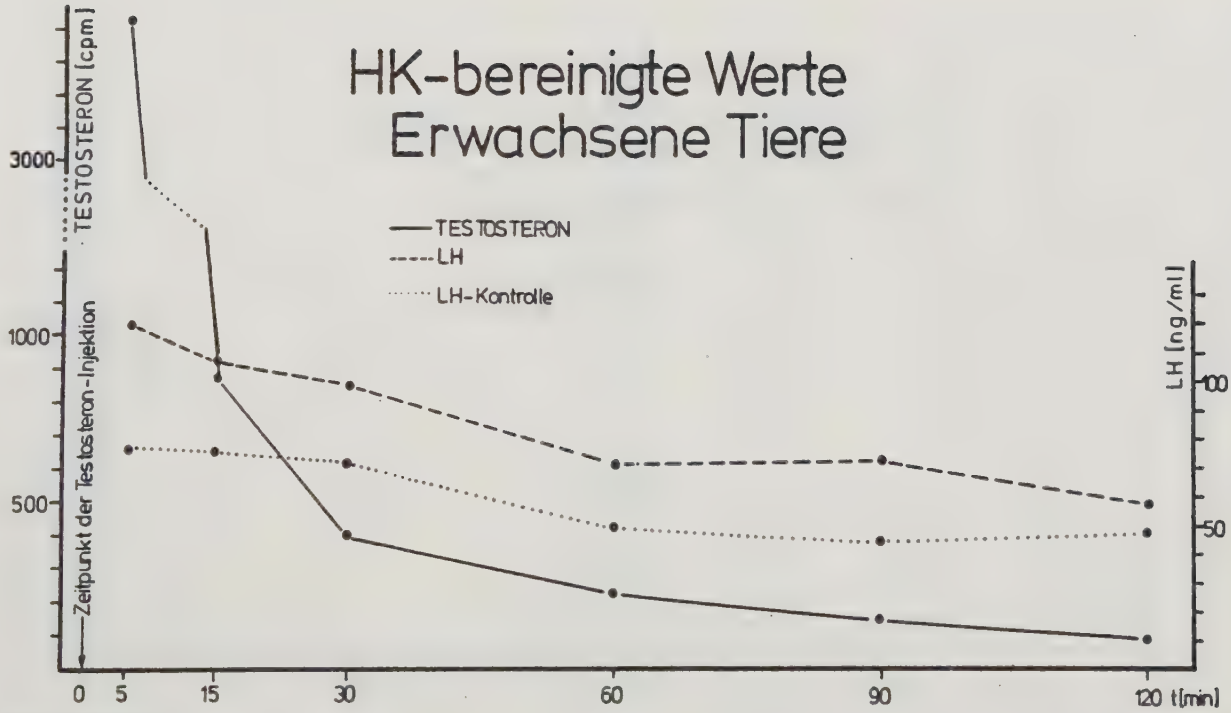


Abbildung Nr. 12

zeigt die Kurven der Altersgruppe von 90 Tagen nach Korrektur der durch die Volumensubstitution bedingten Verdünnung anhand des Hämatokritwertes.

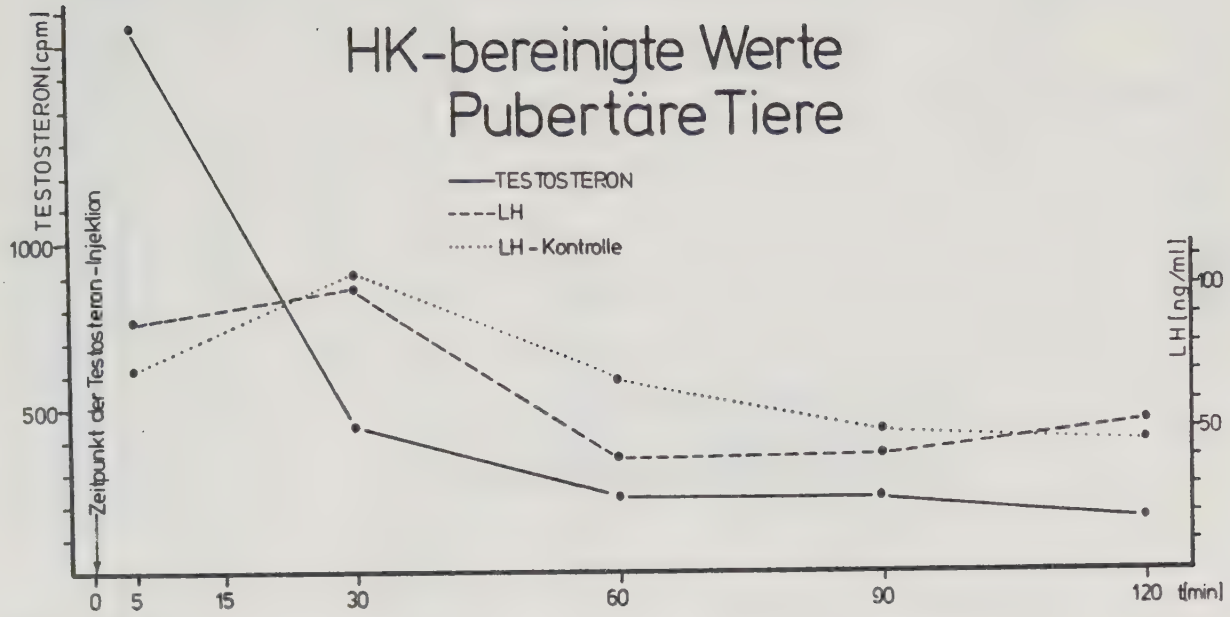


Abbildung Nr. 13

zeigt analog zu Abbildung Nr. 12 die Kurven der Altersgruppe von 35 Tagen

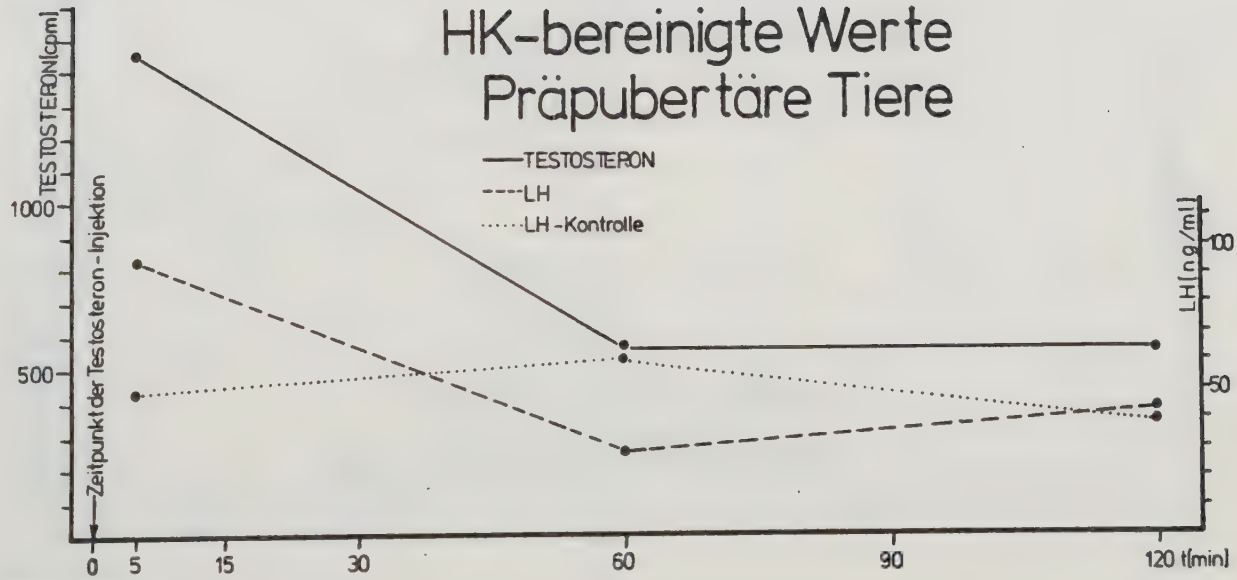


Abbildung Nr. 14

zeigt analog zu Abbildung Nr. 12 die Kurven der Altersgruppe von 20 Tagen

## 5.4. Verdeutlichung der Ergebnisse durch verschiedene Darstellungen der Testosteronkurven

### 5.4.1. Direkt gemessene Werte

Die Abbildung Nr. 15 zeigt eine Zusammenstellung der Testosteronkurven der verschiedenen Altersgruppen, wie sie bereits in den Abbildungen Nr. 9 bis 11 dargestellt waren. Bei der Altersgruppe von 90 Tagen zeigt sich ein steiler Abfall von $t_5$ über $t_{15}$ bis $t_{30}$. Ab $t_{60}$ kommt es zu einer weitgehenden Verflachung des Verlaufs. Die Altersgruppe von 35 Tagen zeigt bis $t_{30}$ einen bereits deutlich schwächeren Abfall und verläuft von da an fast konkruent zur Kurve der 90 Tage alten Tiere, wenn auch minimal nach oben versetzt. In der Altersgruppe von 20 Tagen ist der Abfall am schwächsten und zeigt bei $t_{60}$ und $t_{120}$ deutlich höhere Werte als die beiden anderen Altersgruppen.

### 5.4.2. Korrektur der unterschiedlichen Relationen zwischen Körpergewicht und Gesamtserumvolumen in den verschiedenen Altersgruppen

Dieser Faktor wurde ausgeglichen, indem die Konzentrationen der Altersgruppe von 90 Tagen zum Ausgangspunkt genommen wurden. Die Werte der beiden anderen Altersgruppen wurden entsprechend der in 5.1. ermittelten Relationen auf den Ausgangspunkt zurückgerechnet.

Die entsprechenden Kurvenverläufe sind in Abbildung Nr. 16 dargestellt. Sie zeigen gegenüber den direkt gemessenen Werten keinen prinzipiell anderen Verlauf, sondern verdeutlichen die Tendenz des schwächeren Testosteronabfalls mit abnehmendem Alter. In $t_5$ kommt es entsprechend der vorgenommenen Korrektur zu einer Annäherung der verschiedenen Altersgruppen. Besonders deutlich erscheint der wesentlich schwächere Abfall in der Altersgruppe von 20 Tagen bis $t_{60}$,

ebenso wie die deutlich höhere Restaktivität in $t_{120}$.

5.4.3. Korrektur des Hämatokritabfalls

Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung Nr. 17 dargestellt. Auch diese Darstellungsweise verdeutlicht die Tendenz aus Abbildung Nr. 15, weil der Hämatokritabfall in Altersgruppen von 20 Tagen in $t_{60}$ und $t_{120}$ besonders ausgeprägt war.

5.4.4. Gleichzeitige Korrektur von Hämatokritabfall und unterschiedlicher Körpergewicht-Gesamtserumvolumen-Relation

Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung Nr. 18 dargestellt und zeigen die Tendenz eines verstärkten Abfalls mit zunehmendem Alter am ausgeprägtesten.

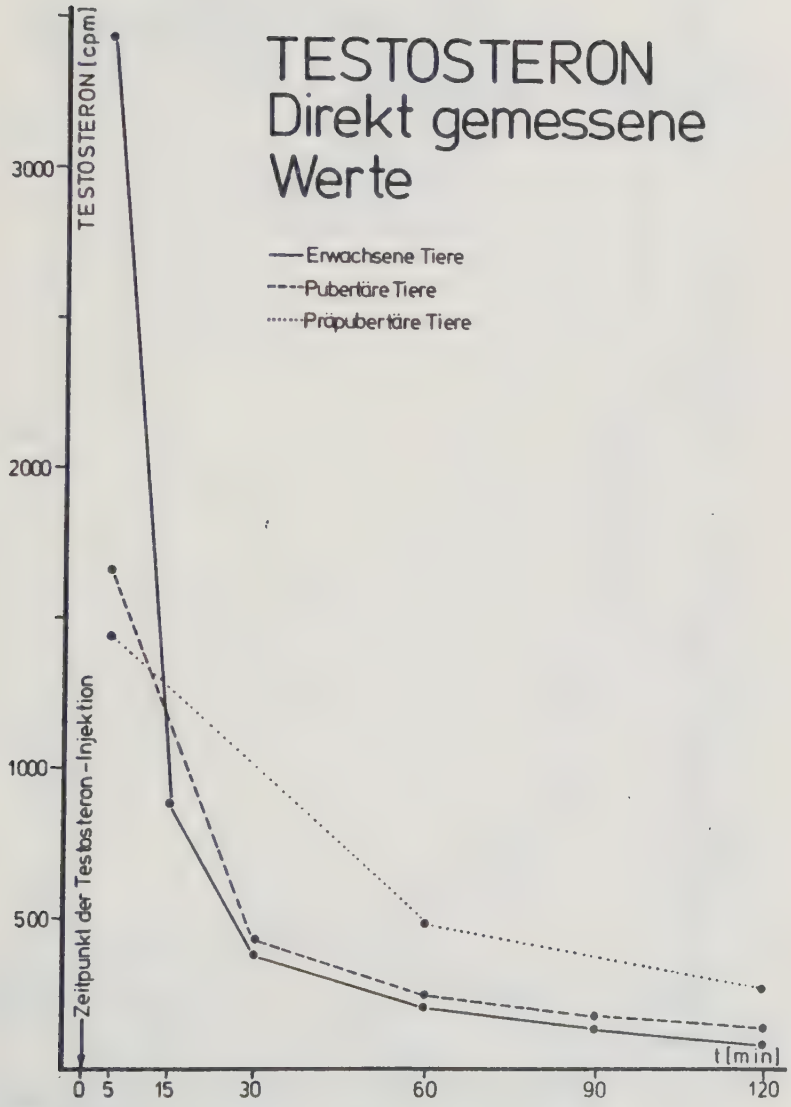


Abbildung Nr. 15
zeigt die direkt gemessenen Konzentrationsverläufe für Testosteron in den verschiedenen Altersgruppen

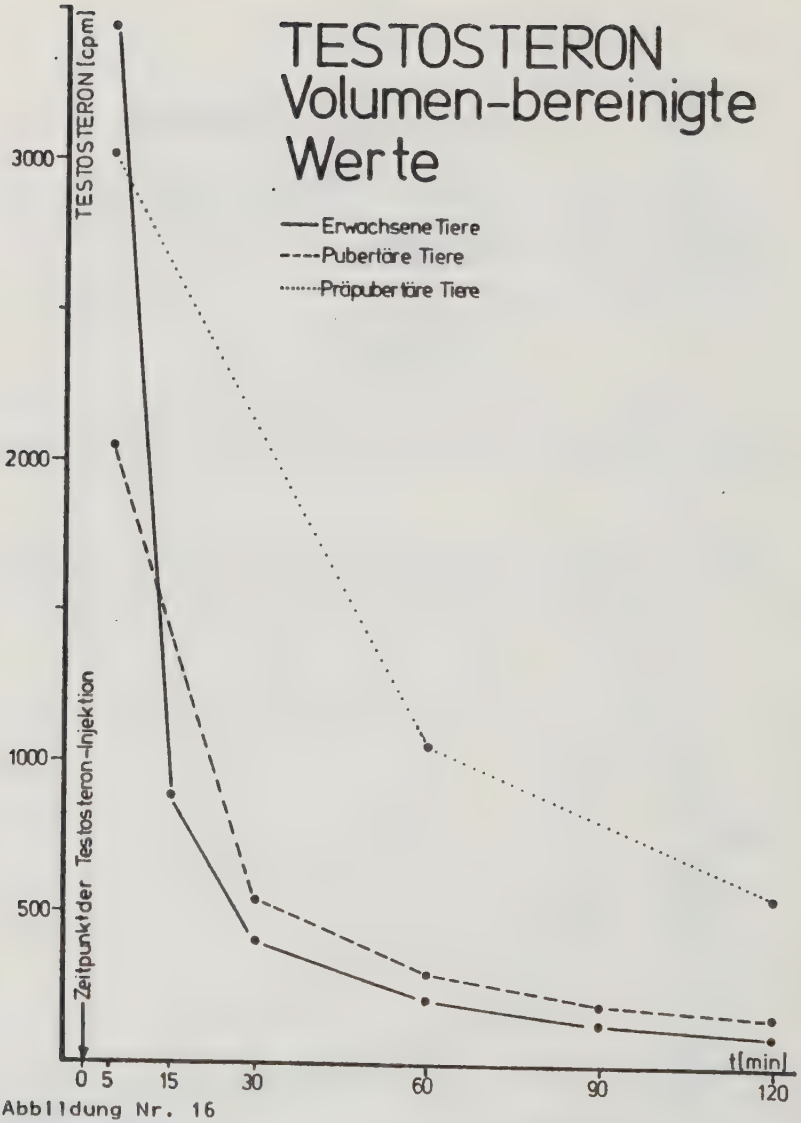


Abbildung Nr. 16

zeigt die Konzentrationsverläufe für Testosteron nach Korrektur der durch unterschiedliche Verhältnisse zwischen Körpergewicht und Gesamtserumvolumen bedingten Verdünnungsfaktoren in den verschiedenen Altersgruppen.

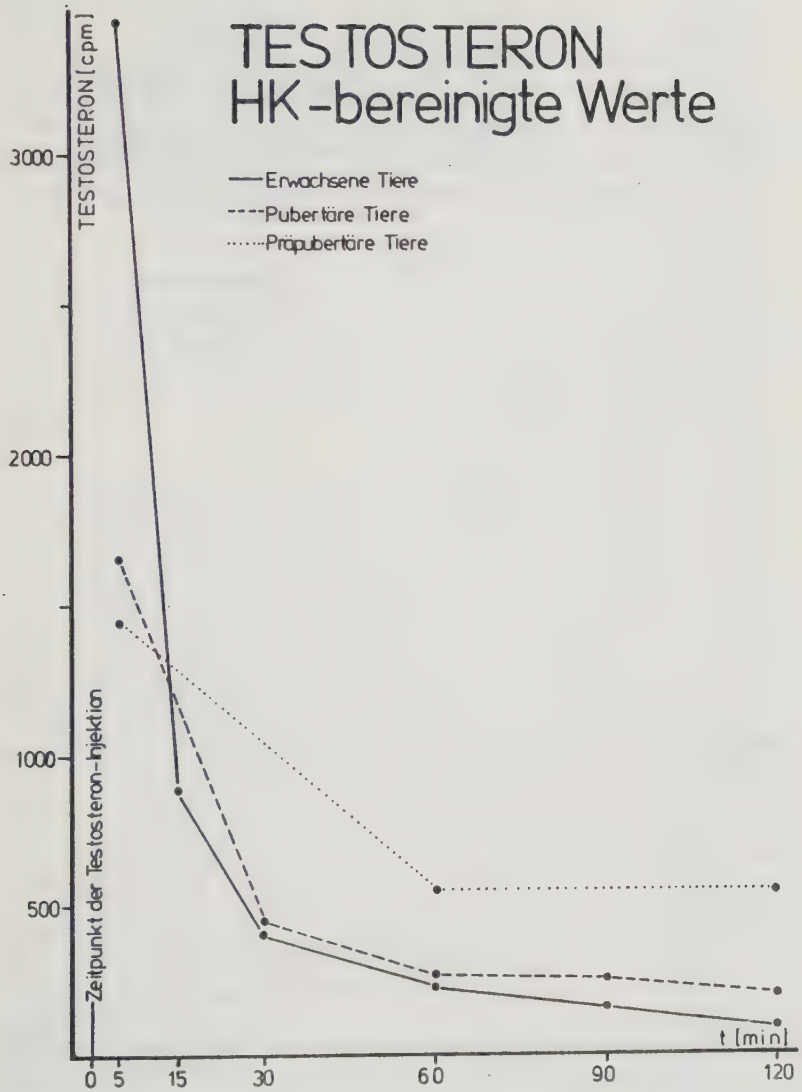


Abbildung Nr. 17
zeigt die Konzentrationsverläufe für Testosteron nach Korrektur der durch die Volumensubstitution bedingten Verdünnung für die verschiedenen Altersgruppen.

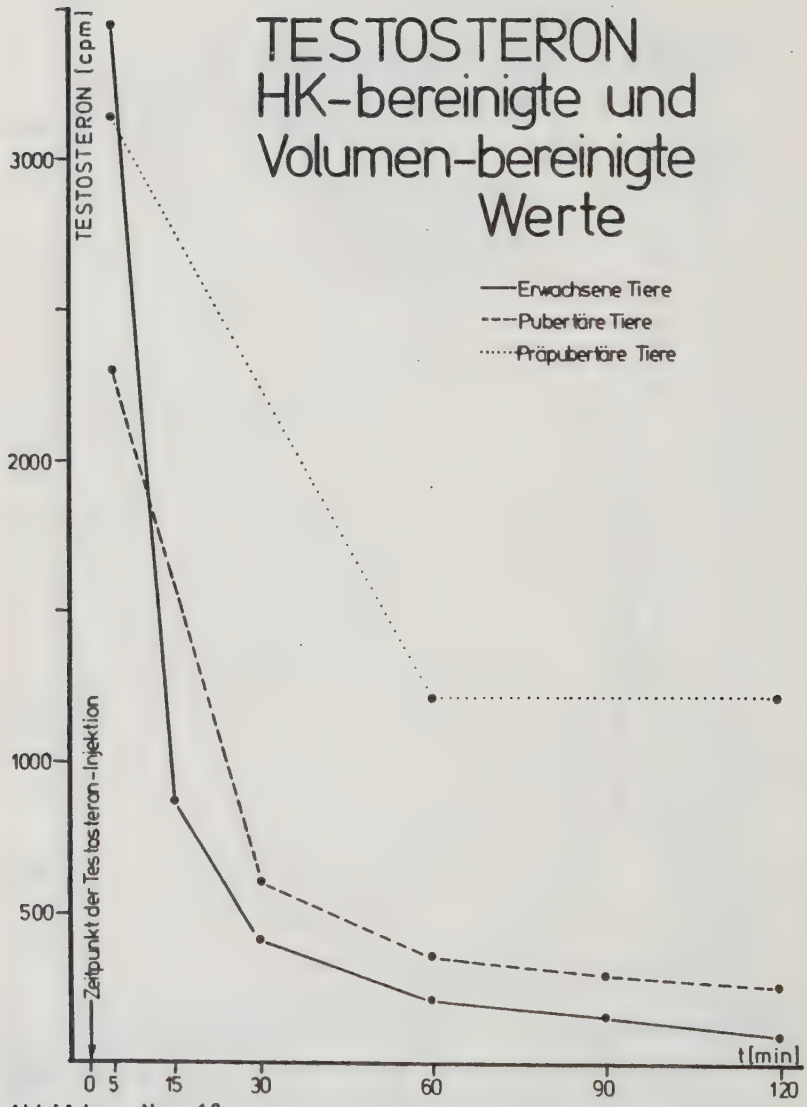


Abbildung Nr. 18
zeigt die Konzentrationsverläufe für Testosteron nach gleichzeitiger Vornahme der Korrekturen aus Abbildung Nr. 16 und Nr. 17 in den verschiedenen Altersgruppen.

## 5.5. Zusammenfassung

Der Aktivitätsabfall des Testosterons ist am stärksten für die erwachsenen Tiere, nimmt ab bei den pubertären Tieren und ist am schwächsten bei den präpubertären Tieren. Verschiedene Korrekturen, die sich aus der Anlage des Versuchs ergeben, bestätigen und verstärken diese Tendenz.

# 6. Diskussion

## 6.1. Narkose

Der Vorteil der Äther-Inhalationsnarkose liegt gegenüber der Narkose mit Pentobarbital (Nembutal$^{R}$) in
- der guten Steuerbarkeit,
- der guten Analgesie,
- dem Ausschluß einer Kumulation und
- dem Ausschluß einer Lebertoxizität.

Der Nachteil liegt in
- dem relativ großen apparativen Aufwand,
- einer relativ komplizierten Methode, die eine entsprechende Übung erfordert,
- der Notwendigkeit einer ständigen Kontrolle der Atmung und
- der Unmöglichkeit einer exakten Dosierung des Äthers.

In diesem Versuch stellt die Inhalationsnarkose mit Äther einfach auf Grund der pharmakologischen Eigenschaften das Mittel der Wahl dar. Das Nembutal ist als Barbiturat nämlich ein reines Schlafmittel und schaltet lediglich die kortikale Wahrnehmung des Schmerzes aus, während die subkortikalen Leitungsbahnen unbeeinflußt bleiben. Der Thalamus als zentrale Schaltstelle der Schmerzempfindung steht ja nicht nur mit dem Kortex in Verbindung, sondern leitet Schmerzimpulse an den Hypothalamus und das limbische System weiter, von wo aus endokrinologische Systeme irritiert werden können. Des weiteren vermag der Schmerz über die Formatio reticularis die vegetativen Zentren des Mittelhirns zu beeinflussen. (17 - 20).

All dies bleibt bei einer reinen Barbituratnarkose unbeeinflußt. Allein unter diesem Aspekt erscheint eine alleinige Injektionsnarkose mit Nembutal obsolet. Zumindest müßte das Nembutal mit einem Analgetikum kombiniert werden.

Demgegenüber verfügt der Äther über eine ausreichende Analgesie und bietet außerdem die Gewähr, daß es nicht über eine Lebertoxizität zu einer Behinderung des Testosteronmetabolismus kommt.

## 6.2. Die Materialgewinnung

Die in diesem Versuch praktizierte Methode zur Materialgewinnung erlaubt, an jedem einzelnen Tier mehrere Hormonbestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Dies ist zweifellos ein Fortschritt gegenüber der individuellen Streuung, die man in Kauf nehmen muß, wenn man für jeden Meßpunkt ein Tier opfert.

Dieser Vorteil wird jedoch mit einem erheblichen Nachteil auf der anderen Seite erkauft. So stellt nämlich die mehrmalige Blutentnahme von jeweils 0,5 ml je Meßpunkt eine erhebliche Belastung für die Tiere dar. Dies gilt insbesondere für die präpubertären Tiere. Man kann sagen, daß nach spätestens 1 Stunde der Versuch nur noch unter vitaler Gefährdung des Tieres abläuft. Zwar konnte durch die sofortige Volumensubstitution mit physiologischer NaCl-Lösung das zirkulierende Volumen annähernd konstant gehalten werden, dennoch kam es zu einem Verlust an Erythrozyten, der nicht zu kompensieren war. Man muß also trotz weitgehend intakter Zirkulation mit hypoxischen Schädigungen rechnen.

Es findet also keine Untersuchung endokrinologischer Funktionen unter physiologischen Bedingungen statt. Vielmehr werden Tiere untersucht, deren Kreislauffunktionen relativ stark beeinträchtig sind. Unter dieser entscheidenden Einschränkung müssen alle Ergebnisse gesehen werden.

Für die weiteren Versuche dieser Art kann man aus den Erfahrungen dieser Arbeit festhalten, daß es unbedingt erforderlich ist, die individuelle Streubreite noch weiter einzu-

schränken. So sollten nur Tiere verwendet werden, die den operativen Eingriff und die erheblichen Blutverluste während des Versuchs annähernd gleich tolerieren. So wäre zum Beispiel zu überlegen, ob es im Falle eines Kreislaufstillstandes überhaupt sinnvoll ist, ein Tier zu reanimieren, oder ob man diese Tatsache nicht vielmehr als ein Indiz dafür werten sollte, daß das Tier die Eingriffe offenbar deutlich schlechter toleriert hat als die anderen. Würde man solche Tiere aus der Wertung nehmen, so würde sich das Experiment sicherlich verlängern, die Reliabilität aber nähme zu. Die sinnvollste Konsequenz jedoch wäre es, auf Versuchstiere auszuweichen, denen vergleichbare Blutverluste ohne Probleme zugemutet werden könnte, Kaninchen zum Beispiel. Dafür steht jedoch im Moment noch kein adäquates RIA-Verfahren zur Verfügung.

Der unbestreitbare Wert dieser Methode besteht darin, daß tatsächliche Konzentrationsverläufe an einzelnen Tieren bestimmt werden können, was ein höheres Maß an Reliabilität zur Folge hat. Aufgrund der oben angesprochenen Probleme stößt die Methode momentan noch an ihre Grenzen, dennoch dürfte ihr Einsatz gerechtfertigt sein. Wenn noch weitere Überlegungen zur Einschränkung der Streubreite angestellt und realisiert werden können, so kann sie sich zu einer Standardmethode entwickeln.

## 6.3. Ergebnisse

### 6.3.1. Testosteron-Clearance

Die Kurven über den Aktivitätsabfall des Testosterons im Serum zeigen eindeutige Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen. Der Abfall ist am stärksten bei den erwachsenen Tieren, wird schwächer bei den pubertären Tieren und ist bei den präpubertären Tieren am schwächsten. Da die Testosteronkonzentration indirekt über die Aktivität des

markierten Testosterons bestimmt wird, unterscheidet diese Versuchsanordnung nicht zwischen freiem und gebundenem Testosteron. Die gemessene Aktivität ist also ein relatives Maß für die Gesamtserumkonzentration an Testosteron. Das nach Kastration angebotene Testosteron wird also mit zunehmendem Alter schneller aus dem Intravasalraum entfernt.

Über den weiteren Verbleib des Hormons und seine quantitative Verteilung in den diversen Zielorganen kann im Rahmen dieser Versuchsanordnung keine Aussage gemacht werden. Dies zu klären, bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

Klar ist dagegen daß der Testosteronmetabolismus zumindest unter dem engumrissenen Teilaspekt der Resorption aus dem Intravasalraum mit zunehmendem Alter beschleunigt abläuft. Dies ist ein Indiz dafür, daß sich offensichtlich im Rahmen der Pubertät nicht nur die Sensibilität der HHGA auf das Testosteronfeedback, sondern auch der Metabolismus des Testosterons selbst verändert. Wie diese Veränderungen im einzelnen aussehen, welche quantitativen Auswirkungen sie haben und in welcher Weise sie an der Ingangsetzung der Pubertät beteiligt sind, müssen andere Experimente zeigen.

### 6.3.2. Die LH - Verlaufskurven

Die in verschiedensten Arbeiten untersuchten Feedback-Mechanismen von Testosteron und Östrogenen mit einer Suppression der Gonadotropinausschüttung (2-10) konnte im Rahmen dieser Versuchsanordnung nicht bestätigt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber den LH - Kontrollkurven derjenigen Tiere, die nicht mit Testosteron behandelt wurden.

Dies erbringt aber nicht etwa einen prinzipiell neuen Aspekt, sondern muß Anlaß sein, unter der speziellen Frage-

stellung der Gonadotropinausschüttung noch einmal über die Versuchsanordnung nachzudenken.

Die gewählte Versuchsanordnung mutet den Tieren einen erheblichen Blutverlust zu, der durch die Volumensubstitution mit physiologische NaCl-Lösung nur unzureichend ausgeglichen werden kann. Der Erythrozytenverlust bleibt bestehen, sodaß trotz erhaltener Zirkulation mit einer hypoxischen Schädigung des Gehirns gerechnet werden muß.

Des weiteren unterliegen die Tiere einem beträchtlichen Streß, wenn sie innerhalb von 24 Stunden zwei operative Eingriffe mit Narkose, sowie erhebliche Blutverluste erfahren. Ebenso ist eine zusätzliche Irritation des Hypothalamus durch Schmerzimpulse aus dem Thalamus nicht völlig auszuschließen, wenngleich dieser Faktor durch die Verwendung eines analgetisch wirksamen Narkosemittels vernachlässigt werden kann.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, daß die Versuchsanordnung eine erhebliche Beeinträchtigung der Tiere mit sich bringt, die insbesondere bei den präpubertären als eine vitale Gefährdung anzusehen ist. Ob unter diesen Bedingungen von einer funktionierenden HHGA überhaupt noch die Rede sein kann, ist fraglich. Möglicherweise sind die Irritationen des Endokriniums so gravierend, daß durch die Versuchsanordnung selbst gerade das außer Kraft gesetzt wird, was eigentlich untersucht werden sollte.

Die genannten Störfaktoren sind zwar bei allen Tieren die gleichen, es ist aber unklar, wie die individuelle Reaktion des jeweiligen Tieres auf diese Faktoren aussieht. Es fehlt an Möglichkeiten, die Auswirkungen auf das Endokrinium quantitativ zu bestimmen, ebenso wie an entsprechenden Erfahrungswerten. Von daher sind die oben angestellten Überlegungen natürlich ihrerseits spekulativ, wenngleich sie

sich aus dem Resultat des Versuchs ergeben.

Während sich also die direkte Bestimmung der Aktivität des applizierten Testosterons einwandfrei durchführen ließ, stößt die Methode der mehrfachen Blutabnahme an einzelnen Tieren offenbar an Ihre Grenzen, wenn Hormone wie das LH bestimmt werden sollen, die einem äußerst störungsanfälligen Regelmechanismus unterliegen. Um diese Methode auch für solche Bestimmungen erfolgreich anwenden zu können, müßten zum einen die quantitativen Auswirkungen der oben genannten Faktoren auf das Endokrinium noch näher erfaßt werden, zum anderen wäre eine systematische Einschränkung der Streubreite durch eine sorgfältige Auswahl der Tiere (siehe 6.2) erforderlich.

## 6.4. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, daß die Tetosteronclearance aus dem Serum mit zunehmendem Alter beschleunigt abläuft. Dies ist ein Indiz dafür, daß für die Ingangsetzung der Pubertät nicht nur eine veränderte Sensibilität der HHGA, sondern offenbar auch ein veränderter Testosteronmetabolismus verantwortlich ist. Auf welchen Veränderungen diese beschleunigte Testosteron-Clearance beruht und welche Auswirkungen sie auf die Gonadotropinausschüttung hat, müssen weitere Arbeiten zeigen.

## 7. Literaturverzeichnis

(1) Gupta, Voelter: Hypothalamic-Pituitary-Testicular Feedback Mechanism during Mammalian Sexual Maturation. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1975

(2) Ramirez V.D. and McCann S. M.: Inhibitory Effect of Testosterone on Luteinizing Hormone Secretion in Immature and Adult Rats. Endocrinology 76 (1965)412

(3) Bodanove E.M.: Analysis of histophysiologic responses of the rat hypophysis and androgen Treatment. Anat. Rec. 157 (1967) 117

(4) Davidson M.: Feedback control of Gonadotropin secretion. In "Frontiers in Neuroendocrinology" (Edited by L. Martini and W.F. Ganong) p. 343, Oxford University Press, New York (1969)

(5) Gay V.L. and Bogdanove E.M. Plasma and Pituitary LH and FSH in castrated rat following short term steroid treatment. Endocrinology 84 (1969) 1132

(6) Swerdloff R.S., Walsh P.C. and Odell W.D.: Control of LH and FSH secretion in the male: evidence, that aromation of androgens to estradiol is not required for inhibitation of gonadotropin secretion. "Steroids" 20 (1972b) 13.

(7) Swerdloss R.S., Jacobs H.S. and Odell W.D.: Hypothalamic-pituitary-gonadal interrelationship in the rat during sexual maturation. In "Gonadotropins" (Edited by B.B. Saxena, C.G. Beling and H.M. Gandy) p. 546 Wiley, New York

(8) Gupta D.: Gonadal steroids and gonadotropin feedback regulation of mammilian sexual maturation. In "Recent Progress in Reproductive Endocrinology" (Edited by P.G. Crosignani and V.H.T. James) Academic Press

(9) Gupta D., Rager K., Zarzycki J. and Eichner M.: Levels of Luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in

the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchism J. Endocr. (1975a) 183.

(10) Gupta D., Eichner M.: Interactions of gonadal steroids gonadotropins and gonadotropin-releasing hormones in sexual maturation, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 11, 579, 1979

(11) Träger Lothar: Steroidhormone, Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1977

(12) Schindler A.E.: Steroid metabolism in foetal tissues. Conversion of testosterone to 5 alpha-DHT in human foetal brain. J. Steroid Biochemistry 7, 97 (1974)

(13) Massa R. and Martini L.: Testosterone metabolism, a necessary step of aktivity? J. Steroid Biochem. 5 941 (1974)

(14) Gerdes H., Littmann K.P.: Die hormonale Funktion von Nebennierenrinde und Testes bei Leberkrankheiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1976

(15) Hagemann: Ratte und Maus als Versuchstier in der Forschung, Gruyter-Verlag, Berlin 1976

(16) Lee, Atkinson: Synopsis der Anaesthesie, S. 31 ff. Volkseigener Betrieb Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, Deutsche Demokratische Republik, 1978

(17) Benzer, Frey, Hügin und Mayrhofer: Lehrbuch der Anaesthesiologie, Reanimation und Intensivtherapie, S. 88 ff, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1977

(18) Keidel: Lehrbuch der Physiologie, S. 19.1 ff, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1979

(19) Ford. Henschler, Rummel: Pharmakologie und Toxikologie, S. 425 ff, B.I. Wissenschaftsverlag Mannheim 1977

Lebenslauf

Am 10. Oktober 1950 wurde ich, Wilfried Harthan, als Sohn des Paul Harthan und der Annaliese Harthan, geb. Wagner in Stuttgart geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule und anschliessend das Wagenburg-Gymnasium in Stuttgart, an dem ich 1969 das Abitur bestand.

Von Oktober 1969 bis Oktober 1971 absolvierte ich eine kaufmännische Lehre bei der Württembergischen Landessparkasse in Stuttgart und leistete anschließend bis März 1973 den Zivilen Ersatzdienst als Krankenpflegehelfer in der Chirurgischen Poliklinik Tübingen ab.

Im April 1973 begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls- Universität in Tübingen, das ich am 1o. April 1981 mit der 3. ärztlichen Prüfung erfolgreich abschloß.